This is a digital copy of a book that was preserved for generations on library shelves before it was carefully scanned by Google as part of a project to make the world's books discoverable online.

It has survived long enough for the copyright to expire and the book to enter the public domain. A public domain book is one that was never subject to copyright or whose legal copyright term has expired. Whether a book is in the public domain may vary country to country. Public domain books are our gateways to the past, representing a wealth of history, culture and knowledge that's often difficult to discover.

Marks, notations and other marginalia present in the original volume will appear in this file - a reminder of this book's long journey from the publisher to a library and finally to you.

Usage guidelines

Google is proud to partner with libraries to digitize public domain materials and make them widely accessible. Public domain books belong to the public and we are merely their custodians. Nevertheless, this work is expensive, so in order to keep providing this resource, we have taken steps to prevent abuse by commercial parties, including placing technical restrictions on automated querying.

We also ask that you:

+ *Make non-commercial use of the files* We designed Google Book Search for use by individuals, and we request that you use these files for personal, non-commercial purposes.

+ *Refrain from automated querying* Do not send automated queries of any sort to Google's system: If you are conducting research on machine translation, optical character recognition or other areas where access to a large amount of text is helpful, please contact us. We encourage the use of public domain materials for these purposes and may be able to help.

+ *Maintain attribution* The Google "watermark" you see on each file is essential for informing people about this project and helping them find additional materials through Google Book Search. Please do not remove it.

+ *Keep it legal* Whatever your use, remember that you are responsible for ensuring that what you are doing is legal. Do not assume that just because we believe a book is in the public domain for users in the United States, that the work is also in the public domain for users in other countries. Whether a book is still in copyright varies from country to country, and we can't offer guidance on whether any specific use of any specific book is allowed. Please do not assume that a book's appearance in Google Book Search means it can be used in any manner anywhere in the world. Copyright infringement liability can be quite severe.

About Google Book Search

Google's mission is to organize the world's information and to make it universally accessible and useful. Google Book Search helps readers discover the world's books while helping authors and publishers reach new audiences. You can search through the full text of this book on the web at `http://books.google.com/`

THE LIBRARY
OF
THE UNIVERSITY
OF CALIFORNIA
Biochemistry

GIFT OF
Professor
Hermann O. L. Fischer

P. SCHOBER
AKADEM. BUCHHANDLUNG
ANTIQUARIAT
BERLIN, N.4.
HESSISCHE STRASSE 8.

III *ol 204
HERMANN O. L. FISCHER

AUS DEM KAISER WILHELM-INSTITUT FÜR CHEMIE

UNTERSUCHUNGEN ÜBER CHLOROPHYLL

METHODEN UND ERGEBNISSE

VON

RICHARD WILLSTÄTTER
UND
ARTHUR STOLL

MIT 16 TEXTFIGUREN UND 11 TAFELN

BERLIN
VERLAG VON JULIUS SPRINGER
1913

Alle Rechte, insbesondere das der Übersetzung
in fremde Sprachen, vorbehalten.
Copyright 1913 by Julius Springer in Berlin.

Druck der Spamerschen Buchdruckerei in Leipzig

Bio-Chem
Z.
GIFT

Vorwort.

Diese Abhandlung umfaßt unveröffentlichte Untersuchungen, die ich in den letzten Jahren gemeinsam mit Herrn Arthur Stoll ausgeführt habe; sie betreffen

die Isolierung des Chlorophylls,

die Trennung und quantitative Bestimmung aller Komponenten des Blattfarbstoffes und

die Hydrolyse des Chlorophylls.

In diesen Arbeiten sind neue Methoden für die Darstellung und den Abbau des Chlorophylls geschaffen worden; mit den neuen Erfahrungen und den leichter zugänglichen Stoffen wurden dann die früheren Versuche über die Umwandlungen des Chlorophylls wiederholt und die meisten älteren Verfahren verbessert.

Um die Arbeit zu einer Darstellung unserer Kenntnis vom Chlorophyll zu vervollständigen, wird sie mit den Ergebnissen der Untersuchungen ergänzt, die ich mit meinen Mitarbeitern in den letzten sieben Jahren in Liebigs Annalen der Chemie veröffentlicht habe. Eine weitere Ergänzung bilden einige noch unveröffentlichte Untersuchungen, die ich mit Herrn H. J. Page über die Pigmente der Braunalgen und mit Herrn M. Fischer über die Beziehungen zwischen Chlorophyll und Hämin ausgeführt habe. Chlorophyll und Hämin werden zu einer gemeinsamen Stammsubstanz abgebaut mit Hilfe von Reaktionen, die einige Aufschlüsse über wesentliche Unterschiede in der Konstitution von Chlorophyll und Hämin geben.

Die folgende Mitteilung macht das Chlorophyll und seine Derivate für künftige Untersuchungen leicht zugänglich. Indem ich gemeinsam mit Herrn A. Stoll die gewonnenen Erfahrungen mitteile, hoffe ich, es dem Chemiker und dem Physiologen zu erleichtern, sich an der Erforschung des Blattfarbstoffes zu beteiligen.

Berlin-Dahlem, Juli 1913.

Richard Willstätter.

Inhaltsverzeichnis.

Seite

Vorwort

Inhaltsverzeichnis

I. Theoretische Einleitung 1
Die Methode 1
Konstitutionsfragen 25
II. Beschreibung des Blattfarbstoffs in einfachen Versuchen 46
III. Die Extraktion der Farbstoffe 53
1. Pflanzenmaterial 53
2. Methoden der Extraktion 58
a) Zustand und Verhalten des Chlorophylls in den Blättern 58
b) Unsere älteren Methoden 64
c) Die Grundlagen der neuen Extraktionsmethode . . . 70
d) Extraktionsmethode mit wasserhaltigen Lösungsmitteln 74
IV. Quantitative Analyse der vier Chloroplastenfarbstoffe 78
1. Bestimmung des Chlorophylls 78
a) Relative Bestimmung 79
b) Absolute Bestimmung 80
2. Das Verhältnis der Komponenten a und b des Chlorophylls 84
a) Zur Geschichte der Methode 84
b) Die Fehlerquellen der Bestimmung 87
c) Die Grundzüge der Methode 94
d) Bestimmung von Chlorophyllpräparaten 96
3. Bestimmung der vier Blattfarbstoffe 99
4. Ergebnisse 109
5. Bestimmung der Braunalgen-Farbstoffe 117
V. Gewinnung von Chlorophyll 126
1. Methode von Willstätter und Hug 126
2. Reinchlorophyll nach Willstätter und Stoll 132
3. Rohchlorophyll 135
4. Chlorophyll aus frischen Blättern 138
5. Beschreibung des Chlorophylls 143
6. Vergleichende Untersuchung des Chlorophylls verschiedener Pflanzen 149

Seite

VI. Isolierung der beiden Komponenten des Chlorophylls 153
1. Zur Geschichte der Methode 153
2. Verfahren von Willstätter und Isler 157
3. Die Chlorophyllkomponenten nach Willstätter und Stoll . 161
4. Beschreibung der Chlorophyllkomponenten 166

VII. Die Wirkungen der Chlorophyllase 172
1. Definition 172
2. Nachweis von Chlorophyllase 174
3. Verbreitung des Enzyms 177
4. Anwendung des Enzyms 178
5. Bestimmung der Hydrolyse durch Trennung mit Alkali . 179
6. Bestimmung der Alkoholyse mittels der Phytolzahl und Jodsilberzahl 181
7. Dynamik der Enzymwirkung 183

VIII. Anwendung des Enzyms zur partiellen Chlorophyllsynthese 188

IX. Die präparativen Verwendungen der Chlorophyllase: Die Chlorophyllide. 194
1. Äthylchlorophyllid („Krystallisiertes Chlorophyll"). . . . 195
2. Methylchlorophyllid aus trockenen Blättern. 201
3. Methylchlorophyllid aus frischen Blättern 203
4. Freies Chlorophyllid aus frischen Blättern 206

X. Isolierung der Komponenten a und b der Chlorophyllide 210
1. Trennung der Methylchlorophyllide 211
2. Trennung der freien Chlorophyllide 216

XI. Beschreibung der Chlorophyllide 219
1. Krystallisiertes Chlorophyll 219
2. Zur Methode der Analyse hochmolekularer Verbindungen. 221
3. Bestimmung der Methyl- und Äthylgruppe nebeneinander. 225
4. Die Methylchlorophyllide a und b. 227
5. Die beiden freien Chlorophyllide 229

XII. Die gelben Pigmente der Chloroplasten 231
1. Vorkommen der Carotinoide 231
2. Isolierung von Carotin und Xanthophyll 237
3. Beschreibung 242
4. Gewinnung und Beschreibung des Fucoxanthins. 247

XIII. Phäophytin 251
1. Definition 251
2. Die älteren Methoden der Säurespaltung des Chlorophylls. 252
3. Gewinnung des Phäophytins 254
4. Beschreibung 259

XIV. Methode der Trennung und Bestimmung von Chlorophyllderivaten 262
1. Fraktionierung mit Salzsäure 262
2. Die Salzsäurezahl 268
3. Die Verteilungszahl 271

Seite

XV. Die Phäophorbide a und b 274
1. Trennung des Phäophytins in die Komponenten 274
2. Fraktionierung der Methylphäophorbide 278
3. Umesterung des Phäophytins mit Chlorwasserstoff und Alkohol 279
4. Bildung und Trennung der freien Phäophorbide 281
5. Beschreibung der Phäophorbide 283

XVI. Phytochlorine und Phytorhodine. 290
1. Darstellung von Phytochlorin e und Phytorhodin g aus den Phäophorbiden 290
2. Bildung aus den Chlorophylliden 296
3. Beschreibung 297
4. Die schwach basischen Phytochlorine und Phytorhodine . 303

XVII. Phytol 308
1. Gewinnung und quantitative Bestimmung 308
2. Beschreibung 311

XVIII. Die Chlorophyllinsalze 313
1. Verseifung in der Hitze 314
2. Verseifung in der Kälte 317

XIX. Einführung des Magnesiums in die Derivate des Chlorophylls 323
1. Einführung von Magnesium mit Magnesiumoxyd und Ätzkali 327
2. Einführung von Magnesium mit Hilfe Grignardscher Verbindungen 328

XX. Abbau von Chlorophyll durch Alkalien: Phylline und Porphyrine 334
1. Übersicht 334
2. Gewinnung der Endprodukte Pyrro- und Phyllophyllin aus Chlorophyll (a + b) 339
3. Zwischenprodukte des Abbaus 345
4. Gewinnung der Porphyrine 351
5. Beschreibung der Phylline 354
6. Beschreibung der Porphyrine 358

XXI. Oxydation der Chlorophyllderivate 369

XXII. Reduktion der Chlorophyllderivate 376
1. Zur Geschichte 376
2. Zerlegung von Hämopyrrol durch fraktionierte Salzbildung mit Pikrinsäure 382
3. Isolierung der Hämopyrrole aus Chlorophyll 387
4. Beschreibung der Pyrrole aus Chlorophyll 389

XXIII. Die carboxylfreien Stammsubstanzen: Ätiophyllin und Ätioporphyrin 391
1. Bildung 391
2. Beschreibung 395

Seite

XXIV. Abbau des Hämins 399
1. Gewinnung von Hämin 399
2. Hämatoporphyrin 402
3. Abspaltung des Eisens mit flüssigem Bromwasserstoff . . 406
4. Mesohämin und Hämoporphyrin 408
5. Ätioporphyrin 411

XXV. Graphische Darstellung der Absorptionsspektra . 414

Literaturverzeichnis 418

Sachregister 420

I. Theoretische Einleitung.

Die Methode.

Die Geschichte der chemischen Untersuchung des Chlorophylls beginnt mit Berzelius[1]), der es zuerst unternahm, das Pigment aus den Blättern zu isolieren. In der Meinung, daß es weder von konzentrierter Salzsäure noch von Alkalien zersetzt werde, hat er den alkoholischen Auszug der Blätter mit so energisch wirkenden Mitteln behandelt und ist daher nur zu Produkten tiefgreifender Zersetzung gelangt. Er urteilt, daß das Blattgrün weder ein Harz noch Wachs oder Fett sei, sondern zu den Farbstoffen gehöre; seine Farbkraft vergleicht er mit der von Indigo.

Die Abhandlung von Berzelius hat auf die Ansichten und die Arbeitsweise der späteren Forscher viel Einfluß gehabt; entweder mit Salzsäure oder mit Alkali wird in der Folge die Isolierung des Farbstoffs angestrebt, so von G. J. Mulder[2]), dann von F. S. Morot[3]) und anderen. F. Verdeil[4]) glaubt Chlorophyll in reinem Zustand zu isolieren, indem er einen siedenden alkoholischen Extrakt mit Kalkwasser fällt und den Niederschlag mit Salzsäure behandelt. Von Verdeil rührt die Hypothese von der Verwandtschaft des Blut- und des Blattfarbstoffs her; nach ihm soll nämlich das Chlorophyll dem Blutfarbstoff sehr ähnlich sein und wie dieser eine bedeutende Menge Eisen enthalten. Der Eisengehalt ist dann

---

[1]) Ann. d. Chem. 27, 296 (1838].
[2]) Journ. f. prakt. Chem. 33, 478 [1844].
[3]) Ann. des Sc. nat. (Botan.) [3] 13, 160 [1849].
[4]) Compt. rend. 33, 689 [1851].

lange Zeit, auch noch in den Arbeiten von E. Schunck[1]), angenommen worden.

E. Frémys[2]) Untersuchungen haben das Verhältnis der grünen zu den gelben Pigmenten der Blätter berührt. Bei der Einwirkung von Salzsäure und Äther auf den Abdampfrückstand eines Extraktes verteilte sich der Farbstoff zwischen einer gelben ätherischen Schicht, nach Frémy „Phylloxanthin" enthaltend, und einer blauen saueren Lösung von „Phyllocyanin". In den beiden Schichten nahm Frémy zwei Komponenten des Blattfarbstoffs an; sie sollten das Chlorophyll bilden, verbunden zu einer Art von farbigem Fett, worin Phylloxanthin das Glycerin verträte, Phyllocyanin die Fettsäure. Später änderte Frémy seine Ansicht, er betrachtete dann das Chlorophyll als ein Gemisch aus diesen Komponenten, von indifferentem Phylloxanthin mit dem Kaliumsalz der Säure Phyllocyanin.

Erst nach einer langen Unterbrechung folgen die Untersuchungen von F. Hoppe-Seyler[3]), welche Verdeils Parallele zwischen Blut- und Blattfarbstoff vertieften und Frémys Vergleich mit dem Fett zur Lecithinhypothese des Chlorophylls weiterentwickelt haben. Diese Arbeiten bilden mit den fast gleichzeitigen von A. Gautier[4]) und von A. Tschirch[5]) und den nachfolgenden von E. Schunck und L. Marchlewski[6]) und denen von W. N. Hartley[7]) eine Periode in der Untersuchung des Blattgrüns, deren Ergebnisse geschichtliches Interesse beanspruchen.

Die Methoden der Behandlung des Farbstoffs werden schonender. Die Frage, ob Säuren und Alkalien zersetzend wirken und welche Veränderungen sie herbeiführen, wird geprüft, allerdings noch

[1]) Proc. Roy. Soc. 50, 308 [1891].

[2]) Compt. rend. 50, 405 [1860], 61, 188 [1865]; Ann. de chim. et de phys. [4] 7, 78 [1866]; Compt. rend. 84, 983 [1877].

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 3, 339 [1879]; 4, 193 [1880]; 5, 75 [1881].

[4]) Compt. rend. 89, 861 [1879].

[5]) Untersuchungen über das Chlorophyll, Berlin 1884; Ber. d. deutsch. botan. Ges. 5, 128 [1887].

[6]) Diese Arbeiten sind vollständig referiert in den drei Monographien von L. Marchlewski: Die Chemie des Chlorophylls, Hamburg 1895; Artikel „Chlorophyll" in Roscoe-Schorlemmer-Brühl 8, 848 [1901]; Die Chemie der Chlorophylle, Braunschweig 1909.

[7]) Journ. Chem. Soc. 59, 106 [1891] und 85, 1607 [1904].

nicht richtig beantwortet. Die chemische Untersuchung tritt mehr und mehr in Abhängigkeit von der spektralanalytischen Methode, deren Nutzen weit überschätzt wird; sie hat nicht vor schweren Irrtümern geschützt. Manche bedeutende Veränderung des Chlorophylls und seiner Derivate ist nämlich ohne Einfluß auf das Absorptionsspektrum, während andererseits gewisse konstitutionell geringfügige Änderungen unverhältnismäßig große Änderungen im Spektrum hervorrufen.

Ein einziges Resultat aus den Arbeiten jener Zeit ist bleibend: die Erkenntnis einer gewissen Verwandtschaft zwischen Hämin und Chlorophyll, die freilich weniger nahe ist, als man immer annahm, und die in ihrer Bedeutung überschätzt wurde.

Hoppe-Seyler hat im Jahre 1879 Chlorophyll zu isolieren versucht und dabei energische Mittel, überhaupt chemische Reagenzien vermieden; unabhängig von ihm hat A. Gautier das Nämliche angestrebt. Das ist, wie wir heute wissen, der richtige Weg, aber die Ausführung des Versuches war nicht erfolgreich. Hoppe-Seyler extrahierte frisches Gras mit siedendem Alkohol; aus dem eingedunsteten Extrakt ist durch eine Folge von Trennungs- und Reinigungsoperationen ein krystallinisches Präparat, das Chlorophyllan, von olivgrüner Farbe in Lösung, hervorgegangen. Die erhaltenen Präparate waren nicht etwa unreines Chlorophyll, sondern sie waren überhaupt kein Chlorophyll mehr. Der Farbstoff hatte duch die Pflanzensäuren des Extraktes und das Erwärmen in alkoholischer Lösung gelitten, von Beimischungen war er nicht frei. Daher konnte die Analyse einen Phosphorgehalt von 1,4% ergeben und zu der Vermutung führen, Chlorophyll zähle zu den Lecithinen. Die von Hoppe-Seyler vorsichtig geäußerte Hypothese wird bis zum heutigen Tage von J. Stoklasa[1]) heftig verfochten, der im Chlorophyll Phosphor und Kalium findet und zwar noch mehr Phosphor als im Lecithin.

Die Analyse des Chlorophyllans war also ohne Nutzen, aber von bleibender Bedeutung ist eine Reaktion, die Hoppe-Seyler mit der Substanz vornahm. Bei dem Erhitzen mit Alkalien auf

[1]) Ber. d. deutsch. botan. Ges. **26**, 69 [1907] und **27**, 10 [1909]; Mitt. d. Kalisyndikates IV, 73 und 85 [1908].

hohe Temperatur beobachtete er seine Umwandlung in einen purpurroten Farbstoff, den er Dichromatinsäure nannte. Er fand ihn sehr zersetzlich; so erklärte er die von Salzsäure bewirkte Farbänderung als die Folge einer Zersetzung. Das mit Säure entstehende Derivat erinnerte ihn in seinen optischen Merkmalen auffallend an Hämatoporphin, das er aus Hämin mit konzentrierter Schwefelsäure erhalten hatte; das Chlorophyllderivat nannte er daher Phylloporphyrin. Dies ist die Beobachtung, mit der Hoppe-Seyler einen gewissen Zusammenhang zwischen Chlorophyll und Hämin im molekularen Bau experimentell festgestellt hat; mit Unrecht wird die Entdeckung meistens den späteren Autoren zugeschrieben. Die Beziehung hat in Hoppe-Seylers Nomenklatur einen bleibenden Ausdruck erhalten. Seinem Verdienste tut es keinen Abbruch, daß er das Mißgeschick hatte, bei der Analyse der Dichromatinsäure den Stickstoffgehalt zu übersehen. Die Analyse ist von Schunck und Marchlewski richtiggestellt, indessen die Beobachtungen von Hoppe-Seyler über die Dichromatinsäure sind in der Folge nicht klargelegt worden. Gemäß ihrer Farbe und Fluorescenz enthält wohl die Dichromatinsäure komplexes Metall; der Farbwechsel der in der Tat zersetzlichen Substanz mit Säure beruht nicht einfach auf Bildung eines Salzes, wie angenommen worden ist, sondern auf der Eliminierung des komplexen Metalls, also auf Porphyrinbildung. Das Ausgangsmaterial für den Versuch muß also noch Magnesium enthalten haben. Natürlich war das Produkt nicht entfernt einheitlich oder rein; aber es lagen in der Dichromatinsäure schon Phylline vor, in dem Phylloporphyrin die entsprechende magnesiumfreie Substanz.

Die Porphyrine aus dem Chlorophyll und dem Hämin waren also einander ähnlich, aber durchaus nicht identisch. Bis in die letzte Zeit hat man noch keine identischen Produkte bei dem Abbau beider Pigmente erhalten, außer bei tiefgreifender Spaltung des Farbstoffs, bei der Reduktion und der Oxydation. Nachdem M. Nencki und J. Zaleski[1]) durch reduktive Spaltung mit Jodwasserstoff und Jod-

[1]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 34, 997 [1901].

phosphonium aus Hämin Hämopyrrol erhalten hatten, beobachteten M. Nencki und L. Marchlewski[1]) Hämopyrrol auch bei der Reduktion von sog. Phyllocyaninkupferacetat. Wie daraus hervorging, bestehen die Moleküle von Hämatoporphyrin und Phylloporphyrin aus denselben oder aus nahe verwandten Bausteinen. Freilich ist die Zusammensetzung des Hämopyrrols viel weniger einfach, als man lange Zeit annahm. Es ist keine einheitliche Base; Willstätter und Asahina[2]) haben gezeigt, daß es aus einem Gemisch von Pyrrolhomologen besteht, worin ein tetrasubstituiertes Pyrrol (Phyllopyrrol) enthalten ist und worin trisubstituierte Pyrrole überwiegen.

Aus den Beziehungen zwischen den Porphyrinen hat Nencki[3]) biologische Folgerungen zu ziehen versucht. Die Verwandtschaft der für den Lebensprozeß wichtigen Pigmente sollte uns einen Einblick in die entfernteste Vergangenheit der Entwicklung organischer Wesen gestatten und auf die Stammverwandtschaft der pflanzlichen und tierischen Organismen hinweisen. Die Folgerung ging über die experimentellen Grundlagen weit hinaus und war verfrüht. Das Unterscheidende in der molekularen Struktur von Chlorophyll und Hämin ist erst später zutage getreten; es ist entsprechend der ganz verschiedenen Funktion beider Pigmente viel tiefergreifend als die konstitutionelle Verwandtschaft.

Nach Hoppe-Seyler hatten die chemischen Arbeiten nicht mehr die Isolierung des Chlorophylls in Substanz und seine Analyse zum Ziele. Die zahlreichen Untersuchungen von E. Schunck allein und von Schunck und L. Marchlewski[4]) betrafen die bei der Einwirkung von Alkalien und Säuren auf alkoholische Blätterauszüge entstehenden Spaltungsprodukte Phylloxanthin, Phyllocyanin, Phyllotaonin u. a. Der genetische Zusammenhang dieser Verbindungen mit dem Chlorophyll ist nicht ermittelt und über ihre Zusammensetzung sind fast keine Angaben veröffentlicht worden. Das durch Säure gebildete Phylloxanthin gab Asche,

---

[1]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 34, 1687 [1901].
[2]) Abh. XVIII.
[3]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 29, 2877 [1896].
[4]) Siehe die Fußnote 6 auf S. 2.

die als integrierenden Bestandteil Eisen aufwies; die mit Alkalien erhaltenen Abbauprodukte waren frei von Mineralbestandteilen. Gerade umgekehrt finden wir heute beim Abbau von Chlorophyll mit Säure aschefreie Substanzen, mit Alkalien hingegen die Derivate mit einem eigentümlichen und wesentlichen Mineralbestandteil.

In allen Untersuchungen jener Zeit ist für das Chlorophyll kein chemisches Merkmal festgestellt worden, mit welchem es möglich gewesen wäre, das Pigment aus verschiedenen Pflanzen zu vergleichen; daher konnten die Ansichten über Identität oder Verschiedenheit des Farbstoffs in verschiedenen Pflanzen weit auseinandergehen. So stellte A. Gautier[1]) den Satz auf, daß das Chlorophyll verschieden sei in Mono- und in Dicotyledonen, und A. Êtard[2]) publizierte im Jahre 1906 in einem viel beachteten Buche über eine große Reihe von ganz verschiedenen Chlorophyllen aus einer Pflanze und eine unbegrenzte Zahl von Chlorophyllen verschiedener Herkunft.

Auf die gar nicht geradlinige Entwicklung unserer Kenntnis vom Chlorophyll haben wertvolle Beobachtungen von Naturforschern, denen die Anwendung chemischer Methoden ferne lag, keinen Einfluß ausgeübt. Die chemische Literatur nahm die Angaben und Anregungen eines großen Physikers und die von Botanikern nicht auf oder behandelte sie geringschätzig. So sind die wichtigen Andeutungen über die Existenz zweier Komponenten des Chlorophylls, die sich in optischen Abhandlungen von G. G. Stokes[3]) finden, nicht auf fruchtbaren Boden gefallen und die reizvollen mikroskopischen Beobachtungen von J. Borodin[4]) haben nicht der Analyse den Weg gewiesen.

J. Borodin sah unter gewissen Bedingungen, nämlich beim Eintrocknen mit Alkohol befeuchteter Blattschnitte, Krystalle entstehen, die entweder von Chlorophyll oder einem Chlorophyllderivat herrührten. N. A. Monteverde[5]) hat diese Untersuchung

[1]) Compt. rend. **120**, 355 [1895] und nochmals Bull. Soc. Chim. [4] **5**, 319 [1909].
[2]) La Biochimie et les Chlorophylles, Paris 1906.
[3]) Proc. Roy. Soc. **13**, 144 [1864] und Journ. Chem. Soc. **17**, 304 [1864].
[4]) Bot. Ztg. **40**, 608 [1882].
[5]) Act. Horti Petropol. **13**, Nr. 123 [1893].

fortgesetzt und solche Krystalle sogar im kleinen schon isoliert und spektroskopisch gekennzeichnet. Diese Entdeckung blieb nutzlos, bis sie ein zweites Mal im chemischen Laboratorium gemacht wurde. Im Jahre 1907 haben Willstätter und Benz[1]), in großem Maßstab arbeitend, das „krystallisierte Chlorophyll" gewonnen, zu einer Zeit, da die Analyse des Chlorophylls schon mit indirekten Methoden vollendet war.

Noch vor wenigen Jahren war also das Chlorophyll in Substanz unbekannt und es gab noch keine Methode, um eine für die chemische Untersuchung brauchbare Lösung des Pigments aus den Blättern zu bereiten. Die ersten Fragen der Analyse harrten der Lösung; es war unentschieden, welche Elemente dem Molekül des Chlorophylls angehören. Nicht viel mehr war festgestellt als die Tatsache, daß Abbauprodukte des Chlorophylls zu den Pyrrolderivaten gehören.

Die Isolierung des Chlorophylls anzustreben, erschien zunächst aussichtslos wegen seiner Veränderlichkeit, seiner chemischen Indifferenz und wegen der Leichtlöslichkeit des mit so vielen farblosen und gelben Begleitern verdünnten Farbstoffs. Ohne das Chlorophyll selbst zu untersuchen, haben Willstätter und seine Mitarbeiter die Eigentümlichkeiten seiner Konstitution aus der Betrachtung der Derivate abgeleitet, welche bei der Reaktion mit Säure und mit Alkali entstehen.

Wenn man Alkalihydroxyd auf Chlorophyll einwirken läßt, so wird es in Salze von chlorophyllgrüner Farbe verwandelt. Aus dem neutralen Chlorophyll ist eine Säure geworden, die wasserlösliche Salze bildet. Bei der Reaktion mit Alkalien ist also ohne eine bedeutende optische Änderung eine Komponente hydrolytisch abgespalten worden, welche mit einer sauren Gruppe verbunden war. Auf einen andern Teil des Moleküls richtet sich die gelinde Einwirkung von Säure, wobei die Chlorophyllfarbe in Oliv umschlägt; eine salzbildende Gruppe entsteht nicht, die Verseifung wird also dabei vermieden. Daher erreicht man es, bei der Spaltung durch Säure diejenige Komponente des Chlorophylls zu verschonen und im

[1]) Abh. VI.

Spaltungsprodukt aufzufinden, welche durch Alkalien abgetrennt wird, und umgekehrt müssen die Alkaliderivate des Farbstoffs noch eine charakteristische Atomgruppe aufweisen, welche von Säuren auffallend leicht zerstört wird. Gemäß diesem leitenden Gedanken[1]) war es möglich, ehe das Chlorophyll selbst bekannt war, seine Merkmale aus der Analyse der von Säure und Alkali gebildeten Abbauprodukte zu kombinieren — und zwar so vollständig, daß die Analyse am Ende gar nichts Neues mehr ergab, als es schließlich gelang, den natürlichen Farbstoff rein darzustellen.

Die chlorophyllgrünen Carbonsäuren, die Chlorophylline, welche bei alkalischer Hydrolyse in den alkoholischen Blätterauszügen entstehen, sind zwar sehr zersetzlich, sie ließen sich aber aus dem Gemisch mit anderen Produkten der Verseifung einigermaßen rein abtrennen. Aus ihrer ätherischen Lösung wurden sie von Dinatriumphosphat aufgenommen und mit Mononatriumphosphat wieder daraus entbunden. Sie erwiesen sich bei der Analyse[2]) als Magnesiumverbindungen, in denen das Magnesium komplex gebunden ist, also nicht in einem elektrolytisch dissoziierbaren Zustand wie in Magnesiumsalzen, sondern in einer eigentümlichen Bindungsweise und einem Beständigkeitsverhältnis, an dem die Ionenreaktionen des Metalls versagen. Die magnesiumhaltige Gruppe ist zwar sehr empfindlich gegen Säure, aber ungemein beständig gegen Alkalien, so daß sie bei tiefgreifenden Umwandlungen der Moleküle, durch die sogar Carboxylgruppen, eine nach der anderen, abgespalten werden, unversehrt bleibt. Daher fand der Nachweis des Magnesiums und seiner Bindungsart sichere Bestätigung durch den Abbau[3]) der Chlorophylline beim Erhitzen mit konzentrierten alkoholischen Alkalien bis auf 240°; dabei trat eine Reihe gut krystallisierender farbenprächtiger und intensiv fluorescierender Abbauprodukte mit drei, zwei und schließlich einer Carboxylgruppe auf, die sog. Phylline. Alle diese Verbindungen, von denen eine Anzahl nach ihrer schönen blauen und roten Farbe ihre Namen, wie Glauko- und Rhodophyllin erhalten haben und von denen wir ein Dutzend

[1]) Abh. III.
[2]) Abh. II.
[3]) Abh. V, VIII, XXII.

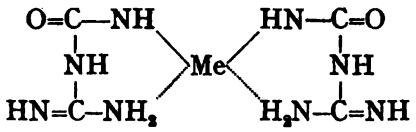
verschiedene im folgenden beschreiben, sind magnesiumhaltige Carbonsäuren. In den hier mitgeteilten Untersuchungen wird der Abbau fortgeführt bis zur carboxylfreien Stammsubstanz, dem Ätiophyllin, dessen Zusammensetzung durch die Formel

$$C_{31}H_{34}N_4Mg$$

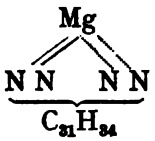
ausgedrückt wird. Der Aschegehalt ist hier infolge der Verkleinerung des Moleküls auf 8 % Magnesiumoxyd gestiegen.

Die sämtlichen Phylline enthalten auf 4 Atome Stickstoff 1 Atom Magnesium. Die Sauerstoffatome, nämlich die Carboxylgruppen, haben keinen Anteil an der Bildung des Metallkomplexes; es sind nur die stickstoffhaltigen Gruppen des Moleküls zur Verfügung, um das Magnesium mit Haupt- und Nebenvalenzen zu binden.

Diese Vorstellung erhält in Übereinstimmung mit den Anschauungen von A. Werner[1]) über die Konstitution von komplexen Metallverbindungen und in Analogie mit den von H. Ley[2]) und von L. Tschugaeff[3]) erforschten Metallderivaten der Säureimide, des Biurets und des Dicyandiamidins z. B. von der Formel



einen Ausdruck, nach welchem sich in den zwei Valenzen, die an den Stickstoff zweier Pyrrolkerne gebunden sind, die Affinität des Magnesiums nicht erschöpft; durch Partialvalenzen verbindet es sich noch mit zwei anderen Pyrrolstickstoffen zum Komplex.



(Ätiophyllin)

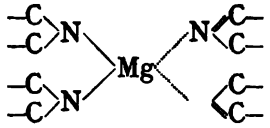
---

[1]) Neuere Anschauungen auf dem Gebiete der anorganischen Chemie. 2. Aufl., Braunschweig 1909.

[2]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 40, 705 [1907].

[3]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 40, 1973 [1907].

oder ausführlicher:



Die sämtlichen Phylline verlieren unter der Einwirkung von Säuren das Magnesium und sie gehen dadurch in mehrbasische und einbasische Carbonsäuren über, die außer den sauren auch charakteristische basische Eigenschaften aufweisen. Da sie mit dem von Hoppe-Seyler, Tschirch, Schunck und Marchlewski untersuchten, wenn auch noch nicht einheitlich erhaltenen Phylloporphyrin eine natürliche Gruppe bilden, so werden sie als Porphyrine bezeichnet und zwar mit demjenigen Präfixum, das dem entsprechenden Phyllin zukommt.

Das Verhalten der beim Abbau entstehenden Phylline gegen Säure belehrt uns über die Reaktion der Säuren auf die Chlorophyllösung. Dabei erfolgt eine augenfällige Veränderung; die Farbe schlägt in oliv um und die Fluorescenz wird schwächer. Das magnesiumfreie Derivat des Chlorophylls, das wir Phäophytin genannt haben, ist ein sehr leicht zugängliches Produkt geworden auf Grund der Entdeckung, daß es bei vorsichtiger Behandlung von alkoholischen Rohchlorophyllösungen mit Oxalsäure geradezu rein und fast vollständig ausfällt. Somit tritt an die Stelle des umständlichen und wenig ergiebigen Verfahrens, nach welchem Hoppe-Seylers Chlorophyllan als Produkt unbeabsichtigter Zersetzung des Farbstoffs unter Mitwirkung pflanzlicher Säuren erhalten worden, eine Methode, welche das Chlorophyll in Form eines reinen Derivates abzuscheiden erlaubt. Es läßt sich mit den Hilfsmitteln des Laboratoriums kilogrammweise gewinnen, wofür das Mehl getrockneter Brennesselblätter ein geeignetes Ausgangsmaterial bildet.

Das Phäophytin enthält keine Asche und es ist frei von farblosen und gelben Begleitstoffen; es ist eine wachsartige Substanz ohne saure Eigenschaften und von schwachbasischer Natur.

In der Farbe seiner Lösungen ist es ganz verschieden von Chlorophyll; mit einem Schlage aber wird dieses Spaltungsprodukt dem

Chlorophyll wieder ähnlich, sobald man in sein Molekül ein Metall einführt, das komplexe Bindung eingeht. Manche Metalle treten sehr leicht ein, z. B. Kupfer und Zink bei der Einwirkung ihrer essigsauren Salze auf die alkoholische Lösung von Phäophytin. Viel schwieriger war es bei der Säureempfindlichkeit des Komplexes, das Magnesium wieder einzuführen. Dies ist schließlich erreicht worden bei der Einwirkung von Grignardscher Lösung, z. B. von Methylmagnesiumjodid, auf Phäophytin oder auf Porphyrine. Ein zweites Verfahren, die Einwirkung von Magnesiumoxyd und Alkali in der Hitze, ist zwar für die Rückbildung des Chlorophylls wegen dessen Alkaliunbeständigkeit nicht anwendbar, aber sehr geeignet für die Bildung der Phylline aus Porphyrinen.

Das Phäophytin verhält sich bei der Verseifung mit Alkalien wie ein Wachs und liefert dabei neben hochmolekularen stickstoffhaltigen Säuren mit 34 Kohlenstoffatomen einen stickstofffreien Alkohol mit zwanzig Kohlenstoffatomen, den Willstätter und Hocheder[1]) aufgefunden und Phytol genannt haben. Dieses entspricht der Formel $C_{20}H_{39}OH$, es ist ein ungesättigter primärer Alkohol mit offener Kette von Kohlenstoffatomen. Untersuchungen über seinen Abbau haben es wahrscheinlich gemacht, daß sein Kohlenstoffgerüst stark verzweigt ist; von seiner Struktur mag folgende freilich in ihren Einzelheiten hypothetische Konstitutionsformel ein vorläufiges Bild geben:

$$\begin{array}{l} CH_3-CH-CH-CH-CH-CH-CH-CH-C=C-CH_2OH \\ \quad\;\; | \quad\;\; | \quad\;\; | \quad\;\; | \quad\;\; | \quad\;\; | \quad\;\; | \quad\;\; | \quad\;\; | \\ \quad CH_3 \;\; CH_3 \;\; CH_3 \;\; CH_3 \;\; CH_3 \;\; CH_3 \;\; CH_3 \;\; CH_3 \;\; CH_3 . \end{array}$$

Es ist nicht unwahrscheinlich, daß Beziehungen bestehen zwischen dem Isopren, dem wohlbekannten Baustein der Terpene und des Kautschuks, und dieser alkoholischen Komponente des Chlorophylls.

Das durch die Säure gebildete Chlorophyllderivat hat also den gesuchten Aufschluß gegeben über die hauptsächliche Änderung, welche die Alkalien an dem Molekül des Chlorophylls bewirken; sie verseifen die Phytolestergruppe. Ihre Wirkung beschränkt sich aber nicht darauf; das Phäophytin, folglich das Chlorophyll,

[1]) Abh. III.

enthält nämlich ferner eine Gruppe —$COOCH_3$, die an zweiter Stelle der Hydrolyse anheimfällt.

Außer der Änderung der zwei Estergruppen erfolgt bei der Einwirkung der Alkalien noch eine eigentümliche Umwandlung, die sich durch einen merkwürdigen Farbumschlag verrät, durch die sogenannte braune Phase. Die Lösung von Phäophytin wie von Chlorophyll wird beim Versetzen mit methylalkoholischem Kali intensiv braun, dann kehrt in einigen Minuten die ursprüngliche Farbe der Flüssigkeit zurück. Beim Stehen in alkoholischer Lösung unterliegt das Chlorophyll leicht einer Änderung, bei welcher ihm dieses Merkmal der braunen Phase verloren geht.

Das Phytol tritt konstant als Komponente des Chlorophylls auf und es macht ein Drittel des Moleküls aus. Diese Erkenntnis hat sich nicht geraden Weges bei der Verarbeitung verschiedener Pflanzen ergeben. Anfangs zeigten die Phäophytinpräparate verschiedener Herkunft erhebliche Schwankungen. Der Phytolgehalt überschritt nie 33 Prozent, blieb aber nicht selten darunter und sank in manchen Fällen bis auf Null. Nun erweisen sich gerade die Pflanzen mit scheinbar phytolarmem Chlorophyll als ausgezeichnetes Material zur Isolierung des Chlorophylls in der Form wunderschöner Krystalle, derselben, die in mikroskopischen Blattschnitten Borodin schon im Jahre 1881 beobachtet hatte.

Monteverde hatte in seiner spektroskopischen Untersuchung dieses krystallisierte Chlorophyll für das natürliche Pigment erklärt und amorphes Chlorophyll als ein Zersetzungsprodukt betrachtet. Diese Ansicht war nicht länger aufrecht zu erhalten. Das krystallisierte Chlorophyll ist phytolfrei, es erweist sich als ein Abkömmling des natürlichen phytolhaltigen Pigmentes, das seinem Gehalt an dem hochmolekularen Alkohol die Leichtlöslichkeit und mehr wachsähnliche Beschaffenheit verdankt.

Die Gewinnung des krystallisierten Chlorophylls in präparativem Maßstab und seine Untersuchung war von besonderem Wert, bis es gelang, den natürlichen Farbstoff selbst in reinem Zustand abzuscheiden.

Die Bildung der krystallisierten Verbindung und das damit Hand in Hand gehende Fehlen des Phytols hat in den letzten

Jahren seine Erklärung gefunden auf Grund unserer Beobachtung, daß bei raschem Extrahieren mancher Blätter der Phytolgehalt normal, aber bei langsamem Extrahieren zu niedrig wird, also bei längerer Berührung des Extraktes mit dem Mehle getrockneter Blätter. Das Chlorophyll wird in den grünen Pflanzenteilen von einem zu den Esterasen zählenden Enzym, der Chlorophyllase, begleitet, die nicht, wie man von den Enzymen im allgemeinen angenommen hatte, in alkoholischen Medien unwirksam ist, die vielmehr die Verdrängung des Phytols durch den als Lösungsmittel angewandten Alkohol veranlaßt, also eine Alkoholyse des Chlorophylls bewirkt. Das Enzym ist sehr verbreitet, aber seine Menge scheint in weiten Grenzen zu schwanken. Nachdem einmal die Dynamik dieser Enzymreaktion genügend studiert war, ist von den Wirkungen der Chlorophyllase in ausgedehntem Maße zu präparativen Zwecken Anwendung gemacht worden. Die Bildung des „krystallisierten Chlorophylls" hat nichts Zufälliges mehr. Aus frischen wie aus getrockneten Blättern läßt sich fast das gesamte Chlorophyll in Form der Äthyl- oder Methylverbindung (Äthyl- oder Methychlorophyllid) abscheiden oder durch Hydrolyse in Form der entsprechenden freien Carbonsäure, des Chlorophyllids.

Umgekehrt gelingt uns auch die partielle Synthese des Chlorophylls aus den zwei Komponenten, nämlich aus Chlorophyllid mit dem Alkohol Phytol durch Esterifizierung unter der katalytischen Wirkung der Chlorophyllase. Die üblichen Methoden der Esterbildung würden in diesem Falle wegen der Empfindlichkeit des Chlorophylls versagen.

Da das Phäophytin die für die Untersuchung geeignetste Form des Chlorophylls ist, auch für den Vergleich des Blattfarbstoffes aus den verschiedenen Pflanzen, so setzt die Beschreibung des Chlorophylls außer der Bestimmung des Magnesiums und des Phytols vor allem die Kenntnis der stickstoffhaltigen Carbonsäuren voraus, welche neben dem Phytol bei der Verseifung von Phäophytin auftreten. Dieses ist zwar reine Chlorophyllsubstanz, aber keine einheitliche Verbindung; seine saure Komponente setzt sich aus verschieden basischen, verschieden farbigen Verbindungen zusammen.

Anfangs hat die Untersuchung zu einer großen Zahl solcher Spaltungsprodukte geführt, welche zwei Gruppen bilden: die einen, Phytochlorine, sind in indifferenter Lösung olivgrün, die anderen, Phytorhodine, prächtig rot. Wegen ihrer großen Zahl sind die einzelnen Verbindungen mit den Gruppennamen und zugefügten Buchstaben bezeichnet worden.

Es wäre kaum gelungen, in die Gemische von verwirrender Zusammensetzung, denen man bei den ersten Umwandlungen des Chlorophylls begegnete, Klarheit zu bringen, wenn uns nicht die basische Natur der Abbauprodukte in ihrer ungewöhnlichen Differenzierung eine Methode zur Bestimmung und Trennung der Chlorophyllderivate in die Hand gegeben hätte, die in keinem Falle versagt hat. Die von Willstätter und Mieg geschaffene Methode[1]) beruht auf der verschiedenen Verteilung dieser Farbstoffe zwischen Äther und verdünnten Salzsäuren. Ein Chlorophyllderivat wird gekennzeichnet durch die Konzentration der Säure („Salzsäurezahl"), die erforderlich ist, um die Substanz aus Äther auszuziehen. Das Verhältnis, in welchem sich diese Basen zwischen Äther und verdünnten Säuren verteilen, verändert sich ungewöhnlich stark mit der Säurekonzentration. Die in Gemischen auftretenden Verbindungen werden daher durch Fraktionierung ihrer ätherischen Lösung mit Salzsäure von verschiedenem Prozentgehalt getrennt. Mit diesem Mittel ist es gelungen, aus Phäophytin die Phytochlorine und Phytorhodine in größerer Zahl rein darzustellen.

Das Auftreten der komplizierten Gemische war aber nur eine Folge gewisser Umwandlungen, denen das in alkoholischer Lösung sehr veränderliche Chlorophyll unter den Versuchsbedingungen anheimfiel, z. B. bei zu langsamem Extrahieren und bei zu langsamem Ausfällen mit Säure. Die Vorbehandlung des Pflanzenmaterials und namentlich seine Extraktion und die Behandlung der Extrakte mit Säure war zu verbessern und gleichmäßiger zu gestalten. Dadurch, daß wir die Ursachen der in Lösungen auftretenden Veränderungen aufsuchten und sie zu vermeiden lernten, sind die Unterschiede zwischen unseren Präparaten seltener und geringfügiger geworden und es ist schließlich gelungen, auf dem Wege

[1]) Abh. I.

über Phäophytin ausschließlich zwei gut krystallisierende und charakteristische Spaltungsprodukte zu erhalten:

Phytochlorin e von der Zusammensetzung $C_{34}H_{34}O_5N_4$ und

Phytorhodin g von der Zusammensetzung $C_{34}H_{34}O_7N_4$.

Das Phytochlorin e ist eine Tricarbonsäure mit zwei freien Carboxylgruppen und einer als Lactam gebundenen. Das Phyt rhodin g ist eine Tetracarbonsäure, von deren Carboxylen sich nur zwei oder drei in freiem Zustand befinden.

Das gemeinsame Auftreten eines grünen und eines roten Spaltungsproduktes bei der aufeinanderfolgenden Hydrolyse des Chlorophylls durch Säure und Alkali stellte eine wichtige Frage. Ist es bedingt durch den Zerfall eines größeren Moleküls in zwei Bruchstücke? Dem steht entgegen, daß wir für Phäophytin das Molekulargewicht von ähnlicher Größe finden wie für Phytochlorin und Phytorhodin. Dann wäre es denkbar, daß eines der Spaltungsprodukte einen früheren, das andere einen folgenden Zustand des Abbaus darstellt. Allein Phytochlorin und Phytorhodin lassen sich nicht ineinander überführen, auch entstehen sie in ganz bestimmten Gewichtsverhältnissen. Es ist vielmehr aus der Bildung des Phytochlorins e und des Phytorhodins g hervorgegangen, daß das Phäophytin, mithin auch das Chlorophyll, ein Gemisch aus zwei Komponenten ist, von welchen die eine das Phytochlorin e beim Abbau liefert, die andere das Phytorhodin g.

Daraufhin haben wir die Auflösung des Komponentengemisches mit physikalischen und mit chemischen Mitteln erzielt.

Der eine Weg, der bei Chlorophyllösungen, bei krystallisiertem Chlorophyll und bei Phäophytin Anwendung findet, besteht in der Verschiebung des gegebenen Komponentenverhältnisses durch ungleiche Verteilung des Farbstoffgemisches zwischen mehreren miteinander nicht mischbaren Lösungsmitteln, z. B. wasserhaltigem Holzgeist und Petroläther oder bei den schwerlöslichen phytolfreien Verbindungen Methylalkohol mit Äther-Petroläther. Die Verschiebung des Komponentenverhältnisses durch zahlreiche Wiederholungen der Operation läßt sich steigern und so ausnützen, daß schließlich die beiden Komponenten von magnesiumhaltigen oder magnesiumfreien Farbstoffen in reinem Zustand vorliegen.

Die andere Methode, die freilich nur bei den magnesiumfreien Verbindungen anwendbar ist, besteht in der Fraktionierung mit Salzsäure nach dem Verfahren von Willstätter und Mieg. Das Phäophytin ist so schwachbasisch und empfindlich in seiner Phytolestergruppe gegen hydrolytische Mittel, daß es nicht nahe lag und besondere Hindernisse bot, diese Trennung auszuführen. Sie hat dennoch zum Ziele geführt und die Ergebnisse der Entmischungsmethode bestätigt.

Mit diesen Feststellungen wird jene Vermutung bestätigt, die schon im Jahre 1864 der englische Physiker Stokes[1]) geäußert hat, leider nur mit ein paar kurzen Worten. Stokes hat spektroskopisch das Chlorophyll als ein Gemisch erkannt und er hat es durch Verteilung zwischen Alkohol und Schwefelkohlenstoff zu scheiden versucht, also den Grund gelegt zu dem Verfahren der Entmischung, das nachher H. C. Sorby[2]) und G. Kraus[3]) weiter ausgebildet haben. Man hat es zumeist angewandt, um zu zeigen, daß gelbe Pigmente den grünen Farbstoff begleiten.

In neuerer Zeit hat der Botaniker M. Tswett[4]) in Warschau die Ansicht von Stokes auf originellem Wege bestätigt, nämlich durch eine Trennung des natürlichen Pigmentes in analytischem Maßstabe mittels fraktionierter Adsorption aus seinen Lösungen. Während es aber bisher schlechterdings unmöglich war, zu prüfen, ob nicht bei der Extraktion und bei den Trennungsoperationen erst Änderungen, vielleicht Spaltungen des Farbstoffes erfolgt sind, ermöglicht jetzt der Abbau zu den typischen Spaltungsprodukten den Nachweis des unveränderten Farbstoffkernes. Zwischen der lange Zeit fast vergessenen Angabe von Stokes und vielen entgegenstehenden Anschauungen, wie den Angaben von Étard über die unendliche Variabilität des Chlorophylls, kann jetzt erst die Entscheidung erbracht werden, da die chemischen Merkmale des Blattgrüns genügend festgestellt sind. So ist die chemische Kennzeichnung des Chlorophylls die Voraussetzung gewesen, um das Pigment

[1]) l. c.
[2]) Proc. Roy. Soc. 21, 442 [1873].
[3]) Zur Kenntnis der Chlorophyllfarbstoffe und ihrer Verwandten. Stuttgart 1872.
[4]) Ber. d. deutsch. botan. Ges. 24, 316, 385 [1906].

in unversehrtem und reinem Zustand als Gemisch seiner Komponenten (a und b) zu isolieren und durch seine Analyse die Folgerungen zu bestätigen, welche wir zuvor aus der Untersuchung seiner Derivate gezogen haben.

Chlorophyll in Substanz entspricht folgenden Merkmalen, die sich aus dem Abbau mit Alkali und mit Säure ergeben haben:

Es gibt 4,5% Asche von reiner Magnesia.

Bei der Verseifung durch kurzes Kochen mit methylalkoholischer Kalilauge liefern Chlorophyll und Phäophytin das normale Gemisch von Phytochlorin e und Phytorhodin g; daneben wird ein Drittel von Gewicht an Phytol frei, einem farblosen Öle. Der Farbstoff enthält keine gelben Pigmente mehr, man würde sie beim Ausäthern nach dieser Verseifung bemerken.

Führt man die Einwirkung von Alkali vorsichtig in der Kälte aus, so muß die braune Phase auftreten, bei der reinen Komponente a ein Farbumschlag in Gelb, bei Chlorophyll b in Rot.

Endlich ist der spektroskopische Vergleich des Chlorophylls mit einem frischen Blätterauszug zu erwähnen; bei beginnender Zersetzung des Chlorophylls nimmt die Absorption in der grünen Region auffallend zu.

Die Lösung der präparativen Aufgaben wird durch neue Methoden des Extrahierens gefördert, die in dieser Abhandlung veröffentlicht werden sollen.

Das Material für die Arbeiten in größerem Maßstabe sind getrocknete und zerkleinerte Blätter. Es hat sich gezeigt, daß ein gewisser Wassergehalt der Lösungsmittel das Ausziehen des gesamten Blattfarbstoffs wesentlich beschleunigt. Die Pigmente befinden sich in den Chloroplasten auch nach dem Trocknen in kolloidalem Zustand und sind in diesem schwer löslich; sie werden durch ein Lösungsmittel, welches Salze aus der Blattsubstanz auflöst, ausgeflockt und dadurch leichter löslich gemacht. Zur Isolierung wird das Chlorophyll aus den Extrakten in Petroläther übergeführt. Die große Menge von Beimischungen, die dem Chlorophyll in das wasserhaltige Lösungsmittel folgen und sein Ausziehen erleichtern, wirken auf den Reinheitsgrad der petrol-

ätherischen Farbstofflösung weit weniger ungünstig als die Begleitstoffe des Chlorophylls in Alkohol oder Acetonextrakten von geringem Wassergehalt.

Die Isolierung des Chlorophylls, die Willstätter und Hug[1]) vor zwei Jahren gelungen ist, beruht auf der kolorimetrischen Bestimmung des Reinheitsgrades seiner Lösungen und auf ihrer systematischen Steigerung durch Entmischungsmethoden. Die Verteilung der in den Extrakten enthaltenen Stoffe zwischen mehreren Lösungsmitteln wird in besonderer Weise hier angewandt, um die gelben und noch mehr um die farblosen Begleiter des Chlorophylls abzutrennen. Aus Extrakten, die infolge der großen Menge von farblosen Begleitstoffen nur 8—16prozentiges Chlorophyll enthalten, gehen Lösungen von etwa 70prozentigem Chlorophyll durch die Entmischungsoperationen hervor. Dann endlich verhilft eine unerwartete Beobachtung zur Lösung der Aufgabe. Wenn das Chlorophyll einen gewissen Reinheitsgrad erreicht hat, so ist es zwar noch in alkoholhaltigem Petroläther leicht löslich, aber überraschenderweise nicht mehr in reinem Petroläther. Entfernt man durch Waschen den Äthyl- oder Methylalkohol, so scheidet sich das Chlorophyll aus und es kann durch Umfällen aus Äther mit Petroläther gereinigt werden.

Anfangs war dieses Verfahren mühsam und die Ausbeute gering. Beim Arbeiten nach unserer neuen Extraktionsmethode mit wasserhaltigem Aceton ließ sich aber das Verfahren so vervollkommnen, daß wir jetzt ohne viel Mühe aus einigen Kilogrammen Brennesselmehl das reine Chlorophyll in wenigen Stunden isolieren mit einer Ausbeute von gegen 80% der gesamten Menge, nämlich etwa 6,5 g aus einem kg trockener Blätter.

Das Verfahren läßt sich auf frische Blätter übertragen und wie im ganzen Verlauf der Arbeiten, so ergibt sich auch bei der Darstellung der Chlorophyllpräparate und in ihren Eigenschaften kein Unterschied zwischen frisch gepflückten und getrockneten Blättern. In einer Vorlesungsstunde kann man aus einem Viertelkilogramm frischer Brennesseln ein Viertelgramm reines Chloro-

[1]) Abh. XV.

phyll isolieren; mit mehr Zeitaufwand verarbeitet man auf einmal $2^1/_2$ kg frischer Blätter und gewinnt daraus 4 g Chlorophyll, d. i. etwa $^4/_5$ von ihrem Chlorophyllgehalt.

Wir unterscheiden zwischen Methoden zur Darstellung von Chlorophyll in reinem Zustand und zur Gewinnung von Rohprodukten, die sich als Ausgangsmaterial eignen. Solche Rohprodukte, 90—95 % Chlorophyll enthaltend, werden durch Anwendung der Extraktion mit wasserhaltigem Aceton leicht zugänglich.

Der Blattfarbstoff kann also heute mindestens so leicht isoliert werden wie irgendein anderer Pflanzenbestandteil, wie ein Alkaloid oder ein Zucker.

Bei der Reindarstellung des Blattgrüns war die Abtrennung der gelben Begleiter, die in den Pflanzen außerordentlich verbreitet und mit dem Chlorophyll in den Chloroplasten vergesellschaftet sind, eine wichtige Aufgabe. Das gemeinsame Vorkommen der gelben Farbstoffe mit den grünen weist auf eine bedeutsame physiologische Rolle dieser Carotinoide hin und hat uns veranlaßt, auch sie in reiner Form darzustellen und sie zu analysieren. Sie sind Nebenprodukte bei der Gewinnung der Chlorophyllpräparate geworden.

In jedem grünen Blatt kommen zwei wohlkrystallisierende stickstofffreie Pigmente vor, denen viele Eigenschaften gemeinsam sind, die aber im Verhalten gegen Lösungsmittel differieren und die hiernach von J. Borodin[1]) und anderen Botanikern unterschieden worden sind. Eines von diesen Pigmenten ist, wie schon A. Arnaud[2]) wahrscheinlich gemacht hat, mit dem lange bekannten Carotin der Möhre identisch. Die Analyse von Willstätter und Mieg[3]) hat ergeben, daß es ein ungesättigter Kohlenwasserstoff von der Formel $C_{40}H_{56}$ ist. Sein Begleiter, das Xanthophyll, war in Substanz noch unbekannt, trotzdem er in den Blättern der Menge nach überwiegt. Er ist nach seiner Zusammensetzung $C_{40}H_{56}O_2$

[1]) Mélanges biologiques tirés du Bull. de l'Acad. Impér. de St. Pétersbourg 11, 512 [1883].

[2]) Compt. rend. 102, 1119 [1886]; 104, 1293 [1887]; Bull. soc. chim. 48, 64 [1887].

[3]) Abh. IV.

als ein Oxyd des Carotins aufzufassen. Der Kohlenwasserstoff ist in Petroläther erheblich löslich, die Sauerstoffverbindung hingegen nur in Alkohol. Den beiden gelben Pigmenten ist eine große Affinität zum Sauerstoff eigen, den sie, namentlich in ihren Lösungen, gierig absorbieren.

Ein drittes Carotinoid findet sich in den Braunalgen, das Fucoxanthin, über dessen Isolierung und Eigenschaften im folgenden zu berichten ist; wo es vorkommt, tritt die Menge der beiden andern zurück. Die Formel des Fucoxanthins ist $C_{40}H_{54}O_6$, in chemischer Beziehung ist es dem Carotin und Xanthophyll ähnlich, aber es zeichnet sich vor ihnen aus durch die beträchtlich basischen Eigenschaften seiner Sauerstoffatome, durch die Bildung charakteristischer blauer Chorhydrate.

Mit der chemischen Kennzeichnung des Chlorophylls und seiner Begleiter sind die Vorbedingungen erfüllt, um das Mengenverhältnis aller Komponenten des Blattfarbstoffes zu ermitteln und um das Blattgrün in den verschiedensten Pflanzenarten zu vergleichen. Das Material für den Vergleich in bezug auf die chemischen Merkmale des Chlorophylls boten über 200 Pflanzen aus zahlreichen Klassen der Kryptogamen und der Phanerogamen. Unsere Methode war die Prüfung des Phäophytins, welches durch rasches Extrahieren der Blätter und rasches Fällen mit Säure abgeschieden wurde, auf seinen Phytolgehalt sowie auf seine basischen Spaltungsprodukte Phytochlorin e und Phytorhodin g und zur Ergänzung der Abbau der Chlorophyllinalkalisalze zu dem krystallisierenden Rhodophyllin, dessen Asche in 7,02% Magnesiumoxyd besteht.

Unser Ergebnis ist die Identität des Chlorophylls in allen untersuchten Pflanzen. Wir finden nur ein einziges Blattgrün, bestehend aus den zwei Komponenten a und b von Chlorophyll. Auch in dem quantitativen Verhältnis zwischen diesen beobachten wir eine große Regelmäßigkeit; a überwiegt, auf fast drei Moleküle Chlorophyll a trifft nur ein Molekül von Chlorophyll b.

Für diese quantitative Beziehung aber bilden eine Ausnahme die Phäophyceen, in welchen neben dem Chlorophyll a nur eine verschwindend kleine Menge der Komponente b vorkommt.

Diese Untersuchung des Komponentenverhältnisses, worüber wir im Kapitel IV eine ausführliche Mitteilung veröffentlichen, betrifft die zwei grünen sowie die zwei gelben Pigmente der Chloroplasten. Die ersteren wurden in der Form ihrer Spaltungsprodukte Phytochlorin e und Phytorhodin g durch Fraktionieren mit Salzsäure getrennt und kolorimetrisch bestimmt. Die Carotinoide, vom grünen Farbstoff nach seiner Verseifung mit Lauge abgetrennt, fraktionieren wir hingegen durch ihre verschiedene Verteilung zwischen Petroläther und verdünntem Holzgeist, um sie gleichfalls mit einem kolorimetrischen Verfahren quantitativ zu bestimmen. Die Analysen ergaben bisher keine bedeutende Abhängigkeit des Komponentenverhältnisses von äußeren Faktoren, wie von der Jahreszeit, der Tageszeit, der Belichtung, und keinen erheblichen Unterschied zwischen dieser und jener Pflanzenart; unter extremen Lebensbedingungen betrugen die Abweichungen von der durchschnittlichen Verhältniszahl nicht mehr als 30% derselben.

Auch das molekulare Verhältnis der grünen zu den gelben Pigmenten ist annähernd konstant, nämlich 3 : 1, und das Verhältnis des Carotins zum Xanthophyll beträgt mit unbedeutenden Schwankungen in Lichtblättern 0,6 : 1.

Die Mengen und die Mengenverhältnisse der Farbstoffe soll ein Beispiel der ausgeführten Analysen veranschaulichen.

In 1 kg trockener Hollunderblätter (entsprechend 4 kg frischer Blätter) sind enthalten:

8,48 g Chlorophyll, nämlich:
6,22 g Chlorophyll a, 2,26 g Chlorophyll b;

1,48 g Carotinoide, nämlich:
0,55 g Carotin, 0,93 g Xanthophyll.

Diese Mengen entsprechen folgendem molekularem Verhältnisse:

Auf 1 Molekül Chlorophyll (a + b) treffen 0,35 Moleküle der Carotinoide.

Auf 1 Molekül Chlorophyll a treffen 0,36 Mol. Chlorophyll b.

Auf 1 Molekül Carotin treffen 1,61 Mol. Xanthophyll.

Solange nur das Gemisch der Chlorophyllkomponenten als Ausgangsmaterial für den Abbau gedient hat, hat es keine Reaktion gegeben, die zu einem einheitlichen Produkt geführt hätte. Geht selbst aus einer reinen Komponente nicht leicht bei irgendeiner Umwandlung ein einheitliches Produkt hervor, da das komplizierte Molekül verschiedene Angriffspunkte bietet, so treten um so kompliziertere Gemische von Reaktionsprodukten durch gleichzeitige Veränderung der beiden Chlorophyllkomponenten auf; erst in den späteren Stufen des Abbaus gelingt es unter genau einzuhaltenden Bedingungen, die zwei ihrer Struktur nach verwandten Komponenten in die nämlichen Derivate umzuwandeln, in Pyrrophyllin und Phyllophyllin.

Die Betrachtung der Reaktionen wird daher vereinfacht, wenn wir ihr die einheitlichen Ausgangsstoffe zugrunde legen.

Das Chlorophyll besteht aus der blaugrünen Komponente a, die ein in Lösung olivgrünes Phäophytin bildet, und der gelblich grünen Komponente b, deren magnesiumfreies Derivat in indifferenten Lösungen rotbraun ist. Bei der Verteilung zwischen Methylalkohol und Petroläther geht in das sauerstoffhaltige Lösungsmittel mehr von der Komponente b über; es zeigt sich bei der Analyse, daß sie die sauerstoffreichere ist. Die Beziehungen in der Zusammensetzung zwischen den beiden Komponenten werden dadurch etwas verschleiert, daß zahlreiche Verbindungen dieser Gruppe zu Hydratbildung neigen und bald mit, bald ohne Wasser, häufig verbunden mit einem halben Molekül auftreten.

Das Material für die Analysen besteht in den Magnesiumverbindungen und ihren magnesiumfreien Derivaten. Nützlicher als die Phytolverbindungen sind dafür die einfacheren phytolfreien Verbindungen, die Methylderivate und die freien Chlorophyllide und Phäophorbide; wir nennen so die Säuren, die durch Hydrolyse der Phytolester entstehen und ein mit α bezeichnetes Carboxyl enthalten. Außerdem ist für die Kenntnis des Unterschieds zwischen den zwei Reihen die Analyse des Phytochlorins e und Phytorhodins g von Bedeutung.

Es hat sich daraus ergeben, daß die beiden Chlorophyllkomponenten nicht nur im Magnesium- und Phytolgehalt übereinstimmen,

daß sie auch in der Zusammensetzung des basischen Kernes einander sehr nahe stehen; diese Beziehung wiederholt sich in allen parallelen Stufen des Abbaus. Wir folgern aus den Analysen, daß der Unterschied zwischen der a- und der b-Reihe wahrscheinlich in einem Molekül Sauerstoff besteht, indem zwei Atome Wasserstoff des Chlorophylls a durch 1 Atom Sauerstoff im Chlorophyll b ersetzt sind, entsprechend den Formeln:

Chlorophyll a, $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$,

Chlorophyll b, $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$.

Diese Annahme ist allerdings nicht bewiesen; wir versuchen mit ihr in vorläufiger Weise die Beziehungen zwischen den beiden Komponenten verständlich zu machen, ohne zu verkennen, daß es weiterer Untersuchungen bedarf, um unsere Erklärung zu erhärten und zu vertiefen; dies ist ein Ziel künftiger Arbeit.

Noch ist nicht eine Komponente zur anderen oxydiert oder die umgekehrte Verwandlung mit Reduktionsmitteln erzielt worden; dennoch sind schon manche Reaktionen bekannt, die für einen einfachen Unterschied in der Oxydationsstufe der zwei Reihen sprechen, z. B. die Einwirkung von Grignardschen Magnesiumverbindungen auf Phytorhodin, wobei durch Addition von Kohlenwasserstoffen Körper der a-Reihe entstehen.

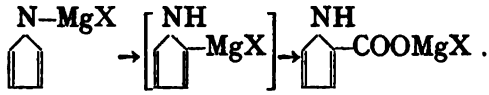
Die Beziehung zwischen den beiden Komponenten in der Zusammensetzung und Konstitution ist für die Erklärung einer chemischen Funktion des Chlorophylls bedeutsam. Für eine Vorstellung davon gibt die analytische Untersuchung einige Anhaltspunkte unter der Voraussetzung, daß die Komponente b ein Oxydationsprodukt von a ist.

Die Rolle des Magnesiums läßt sich nämlich ähnlich wie in den von Barbier und Grignard entdeckten Organomagnesiumverbindungen denken, die in der organischen Synthese durch ihre Reaktionsfähigkeit eine so große Wichtigkeit erlangt haben. Schon in unserer ersten Mitteilung[1]) über die Analyse des Chloro-

[1]) Ann. d. Chem. 350, 65 [1906].

phylls ist ein Vergleich zwischen diesen und Grignardschen Verbindungen gezogen worden; die Parallele[1]) schien ungenau zu sein und begegnete Widerspruch, da sie den Unterschied zwischen der Bindung des Metalls an Kohlenstoff in den gewöhnlichen magnesiumorganischen Verbindungen und der Substitution am Stickstoff im Chlorophyll unbeachtet läßt. Indessen halten wir diesen Unterschied weder für scharf noch charakteristisch.

Seit unserer Veröffentlichung hat B. Oddo[2]) wichtige Untersuchungen über Pyrrolmagnesiumjodid ausgeführt, das mit Kohlensäure und mit Säurechloriden unter Bildung von α-substituierten Pyrrolen reagiert, von α-Carbopyrrolsäure und Alkylpyrrylketonen. Wahrscheinlich entsteht zuerst das N-Magnesiumderivat, das sich weiterhin entweder in die α-Magnesiumverbindung verwandelt oder als solche reagiert. Z. B.



Die Pyrrolmagnesiumderivate haben sich also — vergleichbar mit Natracetessigester — verhalten wie irgendwelche Grignardschen Körper mit Bindung des Metalls am Kohlenstoff.

Das Chlorophyll kann zu der nämlichen Klasse magnesiumorganischer Verbindungen gerechnet werden und es erscheint nicht berechtigt, zwischen dem Magnesiumphenyljodid, dem Pyrrolmagnesiumjodid und dem Chlorophyll eine scharfe Grenze zu ziehen; nur zeichnet sich das Chlorophyll infolge der hinzukommenden komplexen Bindung des Metalls durch eine größere Beständigkeit des Magnesiums gegen Wasser vor den gewöhnlichen Organomagnesiumverbindungen aus.

Dieser Vergleich fordert nicht, daß der Farbstoff im Assimilationsprozeß die Kohlensäure seinem Moleküle einverleibt; dies kann durch die Substitution in den magnesiumtragenden Pyrrolkernen verhindert sein. Vielmehr läßt sich die Funktion des Chlorophylls so denken, daß die Kohlensäure durch die Affinität

---

[1]) Siehe dazu V. Grignard, Bull. soc. chim. [4] 13, Nr. 11, Beilage [1913].

[2]) Gazz. chim. ital. 39, I, 649 [1909] und Ber. d. deutsch. chem. Ges. 43, 1012 [1910].

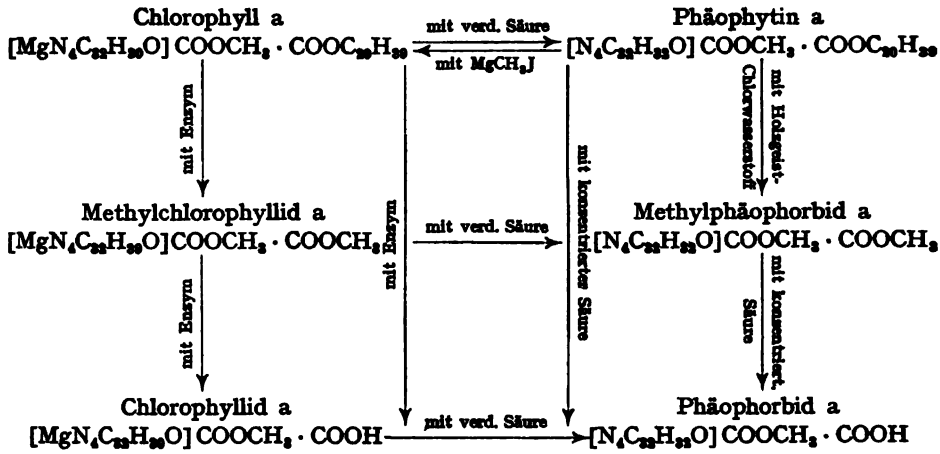
der Magnesiumverbindungen angezogen und daß ihre Reduktion durch die Chlorophyllkomponente a in dem Prozesse bewirkt wird, der die absorbierte Lichtenergie verbraucht. Das Chlorophyll a oxydiert sich dabei zum Chlorophyll b und dieses wird unter Abspaltung von Sauerstoff wieder in die erste Komponente zurückverwandelt; zwischen beiden Komponenten stellt sich ein Gleichgewichtszustand ein.

Es ist entweder möglich, daß diese Abgabe von Sauerstoff aus der Komponente b unmittelbar erfolgt oder daß sich die gelben Pigmente Carotin und Xanthophyll an der Rückverwandlung in das Chlorophyll a beteiligen. Da die Carotinoide konstant in den Chloroplasten die grünen Farbstoffe begleiten, so ist es wahrscheinlich, daß sie mit ihnen durch eine Funktion verbunden sind. Vielleicht ist es ihre Aufgabe, das Verhältnis der Chlorophyllkomponenten zu regulieren, etwa in der Weise, daß Carotin dem Chlorophyll b Sauerstoff entzieht und daß dieser aus dem gebildeten Xanthophyll unter der Wirkung eines Enzyms entbunden wird.

Die Methode für die Bestimmung der vier Komponenten des Blattgrüns bietet dafür Hilfe, das bei der Assimilation der Kohlensäure wirksame System vollständiger zu erforschen.

Konstitutionsfragen.

Die ersten Umwandlungen des Chlorophylls, die für das Beispiel der Komponente a an Hand der Formeln erläutert werden sollen, betreffen das mit Phytol verbundene Carboxyl α. Zu den älteren Methoden des Abbaus mit Säure und Alkali hat sich als dritte die enzymatische Spaltung mittels der Chlorophyllase gesellt, durch welche in alkoholischen Lösungen die einfachen Alphylchlorophyllide, in wasserhaltigen Medien die freien Chlorophyllide entstehen. Diese Verbindungen sind auf keinem anderen Wege zugänglich. Beim Eliminieren des Magnesiums mit Säure liefern sie Alphylphäophorbide, die aus Phäophytin durch Alkoholyse mit Chlorwasserstoff und Methyl- oder Äthylalkohol erhalten werden können, und die freien Phäophorbide, welche wir aus Phäophytin durch Hydrolyse mit konzentrierter Salzsäure gewinnen.

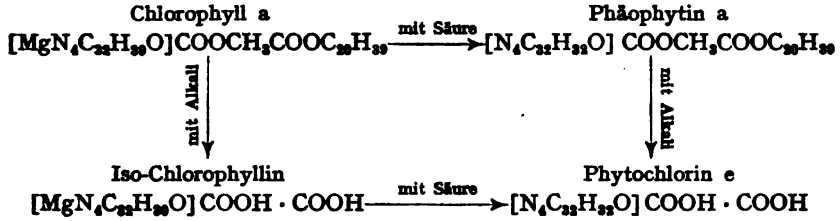


In der b-Reihe verlaufen diese ersten Umwandlungen analog und ergeben folgende Stufen des Abbaus:

$$\underset{\text{Chlorophyllid b}}{[MgN_4C_{32}H_{28}O_2]\,COOCH_3 \cdot COOH} \rightarrow \underset{\text{Phäophorbid b}}{[N_4C_{32}H_{30}O_2]\,COOCH_3 \cdot COOH}\,.$$

Komplizierter ist die Einwirkung der Alkalien. Sie greifen zuerst an derjenigen Stelle an, die bei den anderen Verfahren unversehrt blieb, nämlich am dritten in Form einer Lactamgruppe vorhandenen latenten Carboxyl. Aus jeder Chlorophyllkomponente gehen, je nach den Bedingungen der alkalischen Verseifung, zwei in einheitlichem Zustand erhaltene Alkalisalze hervor, von denen je eines wie Chlorophyll selbst fluoresciert, während dem andern die Fluorescenz fehlt. Die Alkaliverbindungen, die bei gelinder Verseifung in der Kälte vorzugsweise entstehen, Chlorophyllinkalium a und b, gehen beim Austritt des Magnesiums in schwachbasische Phytochlorine und Phytorhodine über, welche für die Kennzeichnung und für den Abbau der Chlorophyllkomponenten von verhältnismäßig geringer Wichtigkeit sind. Die andern, erst später erhaltenen und daher als Isoverbindungen bezeichneten Chlorophylline, durch rasche Verseifung in der Hitze gebildet, sind die komplexen Magnesiumverbindungen des Phytochlorins e und Phytorhodins g, sie gehen in diese wichtigsten Spaltungsprodukte des Chlorophylls beim Ansäuern über. So ist es, übrigens ziemlich spät, gelungen, durch aufeinanderfolgende Behandlung mit Alkali und dann mit

Säure zu denselben Derivaten zu gelangen, wie in umgekehrter Reihenfolge der Prozesse.



Die Beziehung zwischen Chlorophyll und Isochlorophyllin ist aber nicht so einfach, wie dieses Schema erwarten läßt; von den Alkalien ist nicht allein die Verseifung zweier Estergruppen, sondern zuförderst eine Umwandlung bewirkt worden, die am Auftreten der „braunen Phase" kenntlich ist.

Man wird nur in einer Theorie für diese braune Phase den Schlüssel finden zur Erklärung der ersten Stufen des Abbaus, der Veränderung von Chlorophyll in seinen Lösungen und der Bildung verschiedener Reihen von Chlorophyllinen.

Erinnern wir uns, daß bei der Einwirkung von Alkalien auf Chlorophyll und Chlorophyllide die grüne Farbe zuerst in intensives Braun, in Gelbbraun bei der Komponente a, in Rot bei b umschlägt und daß dann in einigen Minuten in den alkalischen Medien die ursprüngliche Chlorophyllfarbe zurückkehrt. Die Reaktion erweckt den Anschein einer gänzlichen Zersetzung und einer Neubildung des Chlorophylls. Sie ist natürlich so zu verstehen, daß eine an dem chromophoren Komplex wesentlich beteiligte Gruppe durch Hydrolyse verändert und daß an ihrer Stelle eine neue ähnliche gebildet wird.

Wir versuchen dieses Verhalten des Chlorophylls als ein „Umlactamisieren" zu erklären, als Öffnung eines vorhandenen Lactamringes und als Schließen eines neuen, zwar ähnlichen, jedoch alkalibeständigen Ringes.

Die Erscheinung ist nicht auf die Magnesiumverbindungen beschränkt. Eine ähnliche braune Phase geben mit Alkali die Phäophytine und die Phäophorbide; das ist der einzige Fall, in welchem die magnesiumhaltigen und die magnesiumfreien Verbindungen

gleiches Aussehen annehmen. Daher denken wir uns während der braunen Phase den komplexen Zustand des Magnesiums unterbrochen. Aus den Phäophorbiden gehen dabei Phytochlorine und Phytorhodine hervor; in diesen Spaltungsprodukten wird daher auch ein Carboxyl lactamartig gebunden sein. Viele Beobachtungen stehen damit im Einklang.

Die Lactamgruppe des Chlorophylls kann sich nicht allein öffnen, wir können auch die Zurückbildung der ursprünglichen Gruppe herbeiführen. Das geschieht beim Versetzen einer ätherischen Chlorophyllösung mit methylalkoholischer Kalilauge, sodann mit Wasser. Die Substanz geht zuerst mit brauner Farbe quantitativ in die alkalische Schicht, darauf gelangt sie durch hydrolytische Dissoziation der Kaliumverbindung unversehrt in den Äther zurück; sie hat keine sauren Eigenschaften angenommen und gibt von neuem die braune Phase. Der ursprüngliche Lactamring ist also wenig beständig, doch bildet er sich am leichtesten. Andere Lactamgruppierungen kommen langsamer zustande, sind aber beständiger; umlactamisiertes Chlorophyll wird nicht mehr aufgespalten von Alkalien.

Die Bildung eines neuen Lactamringes erfolgt auf mehrere Arten; gerade dadurch erklären sich die verschiedenen Reihen der Chlorophylline und das so schwer zu vermeidende Auftreten der schwachbasischen Phytochlorine und Phytorhodine.

Die anfangs vorhandene Gruppe werde bezeichnet:

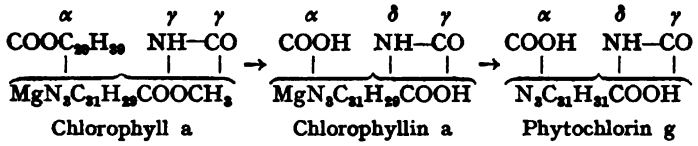
$$\overset{\gamma}{\text{NH}}\text{–}\overset{\gamma}{\text{CO}}$$

Sie kann sich so umlactamisieren, daß das Carboxyl γ in anderer Art mit demselben Stickstoffatom oder mit einer andern Stickstoffgruppe, sie heiße δ, in Verbindung tritt, oder das Umlactamisieren erfolgt derart, daß ein anderes Carboxyl, nämlich α, sich z. B. mit dem Stickstoffatom γ vereinigt.

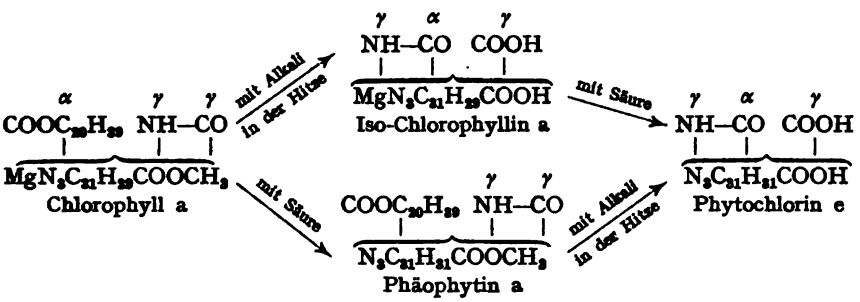
Zwei Richtungen der Chlorophyllinbildung werden dadurch, der Einfachheit halber für das Chlorophyll a, beispielsweise folgendermaßen veranschaulicht.

1. Bei der Verseifung in der Kälte wird zuerst die Lactamgruppe geöffnet, dann verbindet sich überwiegend das frei gewordene

Carboxyl γ mit dem Stickstoffatom δ und zwar geschieht dies auch, wenn das Carboxyl α schon frei ist, nämlich beim Verseifen der sauren Chlorophyllide:



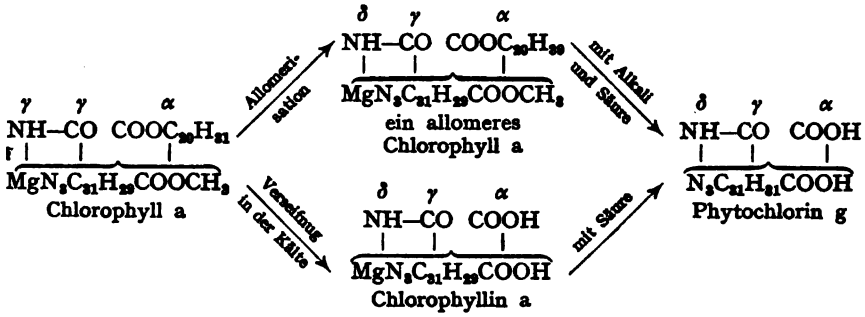
2. Bei der Verseifung in der Hitze verbindet sich das aus der Estergruppe α frei gewordene oder schon frei vorhandene Carboxyl α mit dem Stickstoffatom γ der ursprünglichen Lactamgruppe. Es ist wahrscheinlich geworden, daß von mehreren möglichen Umformungen diese zweite bei energischer Verseifung, z. B. mit konzentriertestem Alkali in der Hitze besonders beschleunigt wird und dadurch quantitativ vollzogen werden kann.



Die Lactamtheorie der braunen Phase, obwohl sie in ihren Einzelheiten noch unsicher ist und noch der Entwicklung bedarf, erklärt auch schon in befriedigender Weise die Veränderungen, welche das Chlorophyll, überhaupt die Alkylchlorophyllide und besonders leicht die freien Chlorophyllide beim Stehen in alkoholischen und anderen Lösungen erleiden. Diese Verwandlungen bezeichnen wir als Allomerisation und die entstehenden Produkte als allomere Chlorophyllderivate. Die Allomerisation ist daran kenntlich, daß die Verbindungen ihre Krystallisationsfähigkeit einbüßen und an Stelle der normalen Spaltungsprodukte die schwachbasischen Chlorine und Rhodine liefern. Natürlich gibt ein allomeres Derivat keine braune Phase mehr.

Die Erscheinung beruht auf Umlactamisieren, nämlich darauf, daß die ursprüngliche Lactamgruppe durch Alkohol geöffnet wird. Das Aufgehen würde einen Gleichgewichtszustand zwischen Lactamform und offener Form ergeben, wenn nicht mehr und mehr von der ursprünglichen Form dem Gleichgewicht entzogen würde durch die allmähliche Bildung einer andern, nicht mehr spaltbaren Lactamgruppe.

Die Chlorophyllkomponente a allomerisiert sich auf verschiedene Weise, z. B. folgendermaßen:



Da die beim ersten Angriff der Alkalien auf Chlorophyll neu gebildeten Ringgruppierungen beständiger sind als die ursprünglichen, so hat der verschiedene Verlauf der Umlactamisierung bleibende Unterschiede in den Produkten des weiteren Abbaus zur Folge. Daher gehen aus den zwei Grundformen jeder Chlorophyllkomponente, aus dem Chlorophyllin und dem Isochlorophyllin, entsprechende Reihen einfacher zusammengesetzter Phylline und Porphyrine hervor; es gibt also im ganzen bei dem Alkaliabbau vier Reihen, die schließlich zu einem einzigen Endprodukt führen.

Durch Erhitzen mit konzentrierter methylalkoholischer Kalilauge im geschlossenen Gefäß wird das Molekül der Chlorophylline durch weitere Umformung seiner sauerstoffhaltigen Gruppen vereinfacht, ohne zersplittert zu werden; zum gleichen Ergebnis führt das Erhitzen der Phytochlorine und Phytorhodine mit Magnesia und Alkali. So entstehen die schön krystallisierenden, einander ähnlichen Phylline; es sind Dicarbonsäuren, die entweder isomer oder nur um zwei Wasserstoffatome verschieden sind, und Monocarbon-

säuren, alle mit komplex gebundenem Magnesium. Sie leiten sich von einer gemeinsamen Stammsubstanz:

$$C_{31}H_{34}N_4Mg,$$

die Ätiophyllin genannt werden soll, dadurch ab, daß ein oder zwei Wasserstoffatome durch Carboxyl ersetzt sind. Ihre magnesiumfreien Derivate, die Porphyrine, die sich durch ihre basischen Eigenschaften kennzeichnen und wohl unterscheiden lassen, sind Carbonsäuren des Ätioporphyrins:

$$C_{31}H_{36}N_4.$$

Aus Isochlorophyllin a entstehen:

die Dicarbonsäure Cyanophyllin, in Lösung blau;
die Dicarbonsäure Erythrophyllin, in Lösung rot;
die Monocarbonsäure Phyllophyllin[1]), in Lösung blaustichig rot.

Aus Chlorophyllin a gehen hervor:

die Dicarbonsäure Glaukophyllin, in Lösung blau;
die Dicarbonsäure Rhodophyllin, in Lösung blaurot;
die Monocarbonsäure Pyrrophyllin, in Lösung blaustichig rot.

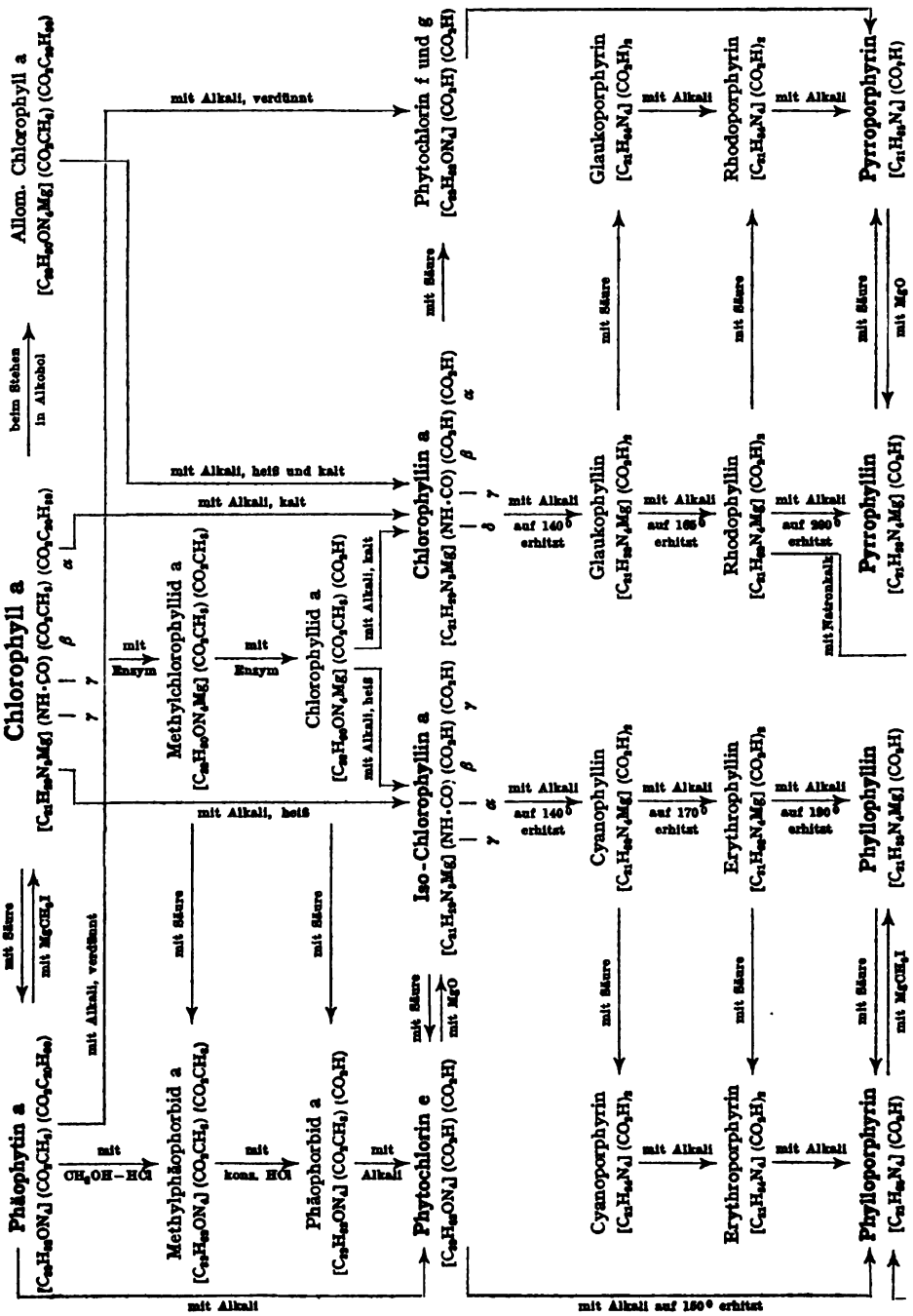
Im Glaukophyllin und Rhodophyllin sind wahrscheinlich die Carboxyle α und β, in Cyanophyllin und Erythrophyllin sind γ und β erhalten; Phyllophyllin ist demgemäß die Monocarbonsäure mit Carboxyl γ, Pyrrophyllin enthält das Carboxyl α.

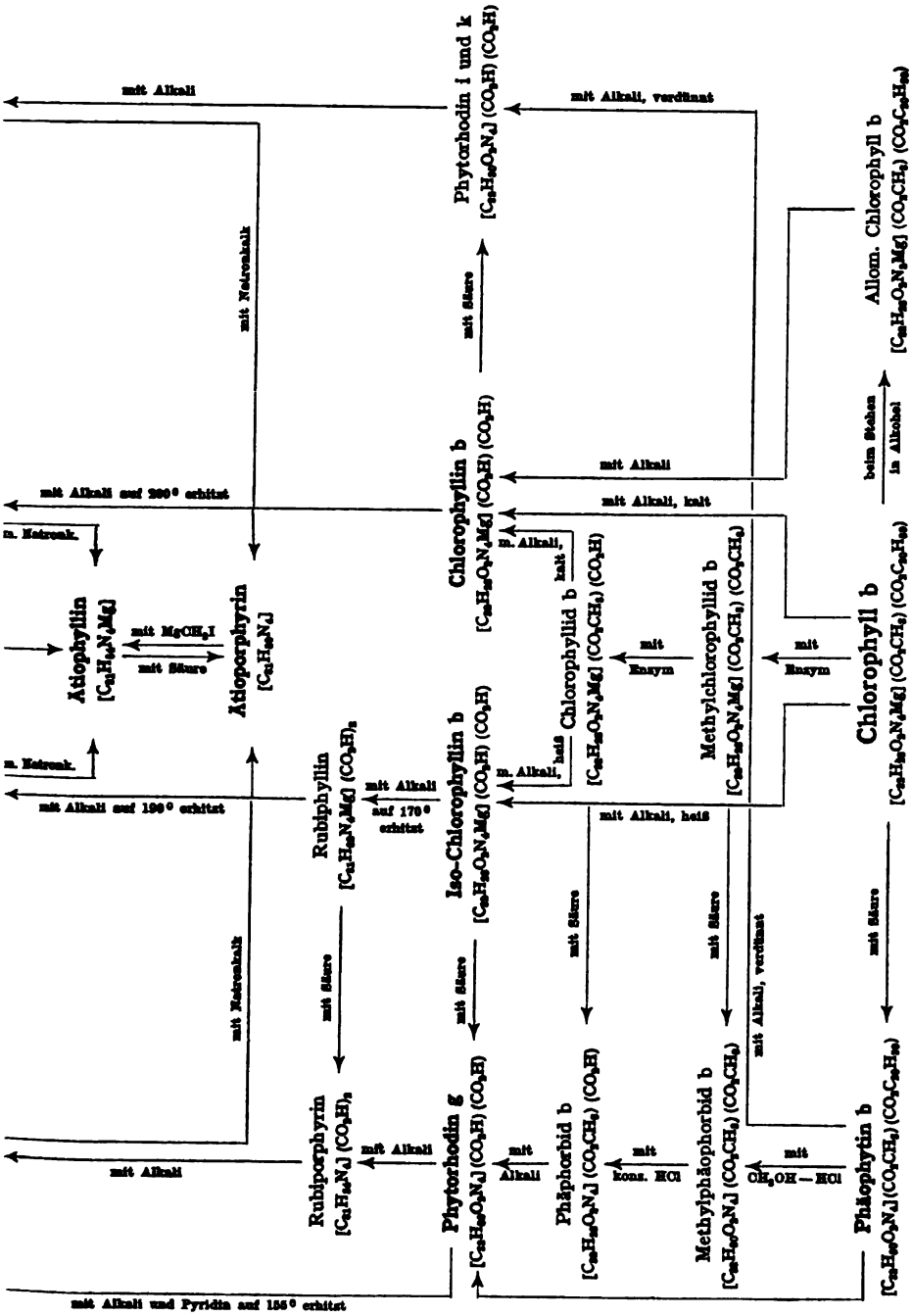
Der entsprechende Abbau der Chlorophyllkomponente b war durch die Neigung ihrer Derivate, amorphe hochmolekulare Produkte zu bilden, erschwert und er nimmt einen etwas komplizierteren Verlauf, da hier zwei sauerstoffhaltige Gruppen in einfache Pyrrolkerne umzuformen sind.

Die zweibasischen Phylline sind hier verschieden von den aus der Komponente a gebildeten, aber am Ende gelangt man zu denselben Monocarbonsäuren, dem Pyrrophyllin aus Chlorophyllin b und dem Phyllophyllin aus Isochlorophyllin b.

Der Zusammenhang der Phylline und Porphyrine und ihre Beziehungen zu den ersten Chlorophyllderivaten wird durch die Tabelle auf den folgenden Seiten veranschaulicht.

[1]) Über die Bezeichnung siehe S. 334.


Allom. Chlorophyll a
Chlorophyll a
Phäophytin a
Methylphäophorbid a
Phäophorbid a
Phytochlorin e
Methylchlorophyllid a
Chlorophyllid a
Iso-Chlorophyllin a
Chlorophyllin a
Phytochlorin f und g
Cyanoporphyrin
Erythroporphyrin
Phylloporphyrin
Cyanophyllin
Erythrophyllin
Phyllophyllin
Glaukophyllin
Rhodophyllin
Pyrrophyllin
Glaukoporphyrin
Rhodoporphyrin
Pyrroporphyrin
mit Alkali, verdünnt
mit Alkali, heiß und kalt
mit Alkali, kalt
mit Alkali, heiß
mit Alkali, verdünnt
mit Alkali auf 150° erhitzt
mit Alkali auf 140° erhitzt
mit Alkali auf 170° erhitzt
mit Alkali auf 190° erhitzt
mit Alkali auf 165° erhitzt
mit Alkali auf 200° erhitzt
mit Natronkalk
mit Säure
mit MgCH₃I
mit MgO
mit Enzym
mit CH₃OH–HCl
mit kons. HCl
mit Alkali
beim Stehen in Alkohol


Phytorhodin i und k
[C35H36O5N4] (CO2H) (CO2H)
mit Alkali
mit Alkali, verdünnt
mit Natronkalk
mit Säure
Allom. Chlorophyll b
[C55H70O6N4Mg] (CO2CH3) (CO2C20H39)
Chlorophyllin b
[C35H36O5N4Mg] (CO2H) (CO2H)
beim Stehen in Alkohol
mit Alkali auf 200° erhitzt
mit Alkali, kalt
n. Natronk.
n. Alkali, kalt
Atiophyllin
[C32H36N4Mg]
mit MgCH3I
mit Säure
Atioporphyrin
[C32H36N4]
Chlorophyllid b
[C35H36O5N4Mg] (CO2CH3) (CO2H)
mit Enzym
Methylchlorophyllid b
[C36H38O5N4Mg] (CO2CH3) (CO2CH3)
Chlorophyll b
[C55H70O6N4Mg] (CO2CH3) (CO2C20H39)
n. Natronk.
mit Alkali auf 190° erhitzt
Rubiphyllin
[C32H36N4Mg] (CO2H)2
mit Alkali auf 170° erhitzt
n. Alkali, heiß
Iso-Chlorophyllin b
[C35H36O5N4Mg] (CO2H) (CO2H)
mit Alkali, heiß
mit Natronkalk
mit Säure
mit Säure
mit Säure
mit Säure
mit Alkali, verdünnt
Rubiporphyrin
[C32H36N4] (CO2H)2
Phytorhodin g
[C34H36O5N4] (CO2H) (CO2H)
Phäophorbid b
[C35H36O5N4] (CO2CH3) (CO2H)
Methylphäophorbid b
[C36H38O5N4] (CO2CH3) (CO2CH3)
Phäophytin b
[C55H72O5N4] (CO2CH3) (CO2C20H39)
mit Alkali
mit Alkali
mit konz. HCl
mit CH3OH — HCl
mit Alkali und Pyridin auf 155° erhitzt

Die Decarboxylierung aller Chlorophyllderivate beim Erhitzen mit Alkalien im Autoklaven führt nur bis zu den Monocarbonsäuren, da bei höherer Temperatur Zersetzung erfolgt. Die Abspaltung des letzten Carboxyls ist schließlich nach der klassischen Natronkalkmethode erzielt worden und zwar bei Phyllinen wie Porphyrinen. Sie gelingt am besten durch kurzes Erhitzen sehr kleiner Mengen eines Porphyrins und noch glatter eines Phyllins mit Natronkalk. Auf diese Weise entsteht aus Phylloporphyrin und Pyrroporphyrin das gleiche Ätioporphyrin, aus den Magnesiumverbindungen das nämliche Ätiophyllin. Es bestätigt sich, daß der Unterschied zwischen den isomeren Monocarbonsäuren nur durch den Ort des Carboxyls bedingt ist.

Die Stammsubstanzen, krystallisierende Verbindungen, fügen sich dem Gruppenbilde ein, das mit den zahlreichen zuerst untersuchten Phyllinen und Porphyrinen gezeichnet worden ist. Sie eröffnen neue Möglichkeiten für künftige Untersuchungen über den Abbau. Auch gewinnen sie dadurch Bedeutung, daß mit ihnen nun zum ersten Male aus Blattfarbstoff und dem Blutfarbstoff identische Umwandlungsprodukte erhalten werden, deren Molekül noch in nahen Beziehungen zu den Farbstoffen selbst steht. Identisch waren bisher nur die Zerfallprodukte von Hämin und Chlorophyll, einfachere Pyrrolderivate, welche die Oxydation und die Reduktion geliefert hat, während die Porphyrine aus beiden Pigmenten manche Ähnlichkeit und manche Unterschiede aufweisen.

In einer Untersuchung von Willstätter und M. Fischer, über die wir im folgenden in Kürze und ausführlicher an anderer Stelle berichten werden, ist der Abbau von dem bekannten Hämatoporphyrin, das sechs Sauerstoffatome enthält, bis zur sauerstofffreien Verbindung durchgeführt worden.

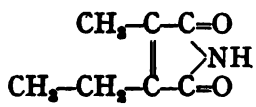
Aus dem Hämin gehen Porphyrine hervor, durch ganz andere Reaktionen als aus Chlorophyll, aber nicht etwa auf einfache Weise durch Austritt des Metalls. Hämatoporphyrin ist nämlich eine Dioxysäure. Es gelang, dasselbe beim Erhitzen mit methylalkoholischer Kalilauge und Pyridin zu einem neuen Porphyrin zu reduzieren, welches wir Hämoporphyrin nennen. Dieses unterscheidet

sich in seiner Zusammensetzung vom Hämatoporphyrin durch das Minus von zwei Hydroxylgruppen; es enthält vielleicht zwei Atome Wasserstoff weniger als Mesoporphyrin. Das Hämoporphyrin steht zufolge der Analyse und seinen Eigenschaften dem Rhodoporphyrin und Erythroporphyrin nahe, gleich diesen läßt es sich beim Erhitzen mit Natronkalk decarboxylieren. Da die Magnesiumverbindungen leichter Kohlensäure abspalten, führen wir in das Hämoporphyrin zunächst Magnesium ein und spalten das Metall aus der carboxylfreien Verbindung am Ende wieder ab. Das Reaktionsprodukt ist identisch mit dem Ätioporphyrin aus Chlorophyll nach Zusammensetzung und Eigenschaften, wie dem Spektrum und seiner basischen Natur, die mittels der Verteilung zwischen Äther und Salzsäure quantitativ geprüft wurde.

Aus der Zusammensetzung $C_{31}H_{36}N_4$ des Ätioporphyrins geht hervor, daß Hämoporphyrin der Formel $C_{32}H_{38}O_4N_4$ entspricht, somit das Hämin nicht der allgemein angenommenen Formel $C_{34}H_{32}O_4N_4FeCl$, sondern der Formel $C_{32}H_{32}O_4N_4FeCl$. Diese steht in der Tat, worauf wir vor längerer Zeit aufmerksam gemacht haben[1]), mit dem bedeutenden analytischen Material für Hämin im Einklang. Unabhängig von dem Abbau zum Ätioporphyrin haben wir es auch bei der Analyse einer größeren Zahl von Porphyrinen aus Hämin sehr wahrscheinlich gefunden, daß die Formeln des Hämins und Hämatoporphyrins in diesem Sinne abzuändern sind.

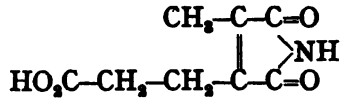
Um für die Struktur der Stammsubstanz Ätioporphyrin einen Ausdruck zu finden, müssen wir die Ergebnisse der Oxydation und Reduktion der verschiedenen Porphyrine berücksichtigen, die in zwei späteren Kapiteln eingehender angeführt werden.

Phylloporphyrin liefert bei der Oxydation mehr als ein Molekül Methyläthylmaleinimid:

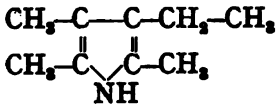


[1]) Ann. d. Chem. 358, 212 [1907].

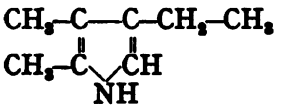
und ein Molekül Hämatinsäure:



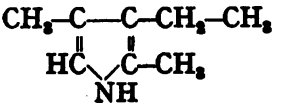
Bei der Reduktion ergeben die Porphyrine Gemische von Pyrrolhomologen, worin namentlich enthalten sind:



Phyllopyrrol



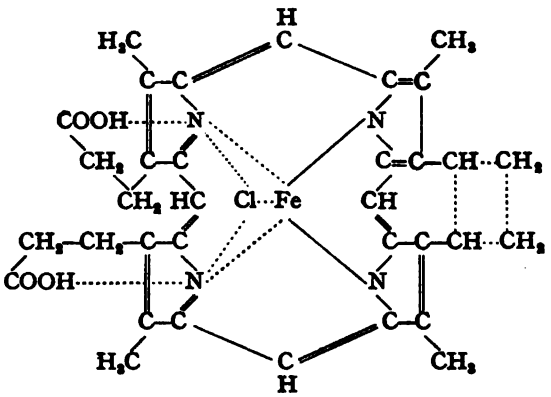
Isohämopyrrol



Kryptopyrrol

Das Ätioporphyrin setzt sich mithin aus vier Pyrrolkernen zusammen. Die Zahl seiner Wasserstoffatome ist auffallend niedrig, die Pyrrole müssen daher so verbunden und substituiert sein, daß dabei im Vergleich mit einfachen Bindungen acht Atome Wasserstoff erspart werden, sei es durch Doppelbindungen oder weitere Ringschlüsse. Einigen Vorstellungen hinsichtlich der Art, in der man die Pyrrolkerne verknüpft denken kann, begegnen wir in der Literatur über Hämin.

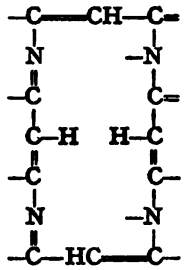
W. Küster[1]) hat das Gebiet des Butfarbstoffs mit folgender Konstitutionsformel des Hämins:



Hämin $C_{34}H_{32}O_4N_4FeCl$.

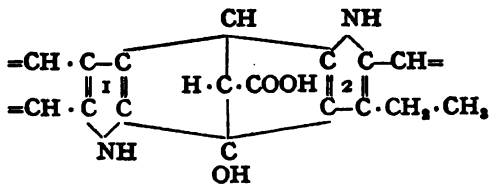
[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 82, 463 [1912].

beleuchtet, welche dem Verlauf der Reduktion und Oxydation Rechnung trägt. Sie fordert indessen den Einwand heraus, daß von den beiden mit dem Eisen verbundenen Iminogruppen, nur die eine als saures Imin eines Pyrrols, die andere aber als basische Iminogruppe eines Dihydropyrrols dargestellt wird. Das Unwahrscheinliche dieser Formel liegt besonders in der Annahme eines aus vier Stickstoffatomen und zwölf Kohlenstoffatomen bestehenden sechszehngliedrigen Ringes:



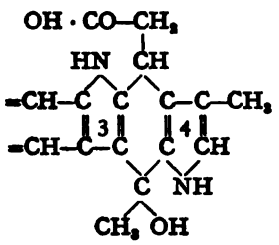
Die ersten Umwandlungen eines derart komplizierten Pigmentes sind so schwer zu enträtseln, daß die Ansichten verschiedener Forscher weit auseinandergehen. Von O. Piloty[1]) wird das Hämin auf zwei miteinander verbundene kondensierte Systeme zurückgeführt, die aus Pyrrolen mit Kohlenstoffsechs- und -fünfringen bestehen:

I



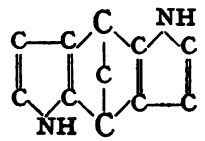
und

II



[1]) O. Piloty und E. Dormann, Ann. d. Chem. 388, 313 [1912].

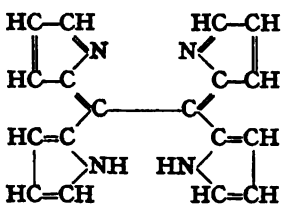
Diese Auffassung ist nur unter der Annahme möglich, daß die Cyclopentan- und Cyclohexanringe bei der Reduktion leicht zerfallen. Das ist wenig wahrscheinlich[1]). Noch bedeutsamer ist der Widerspruch zwischen den Ergebnissen der Oxydation und dem wesentlichen Inhalt dieser Konstitutionsannahmen. Aus Hämin und seinen Derivaten kann gemäß den Formeln von Piloty Hämatinsäure nicht hervorgehen. Die tertiären Kohlenstoffatome der beiden Formeln, zum Beispiel:



machen die Bildung des Propionsäurerestes der Hämatinsäure unmöglich; derselbe Einwand ist gegen die Formel der Bilirubinsäure (Bilinsäure) von O. Piloty und S. J. Thannhauser[2]) zu erheben.

Die eigentümlichen Ringgebilde, welche die angeführten Formeln darstellen, ergaben sich aus der Schwierigkeit, die Vereinigung der Pyrrole zu einem so wasserstoffarmen Moleküle auszudrücken. Es ist eben nicht wohl möglich, wenn man die zur Erklärung der Oxydationsprodukte erforderlichen Äthylgruppen vorsieht, das Ätioporphyrin ohne Annahme eines Kohlenstoffringes zu formulieren.

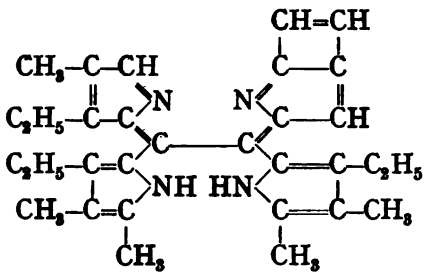
Als eine einfache Verknüpfung von vier Pyrrolkernen, von nur zwei salzbildenden und zwei komplexbildenden, zu einem Farbstoff ist uns folgende Formel wahrscheinlich:



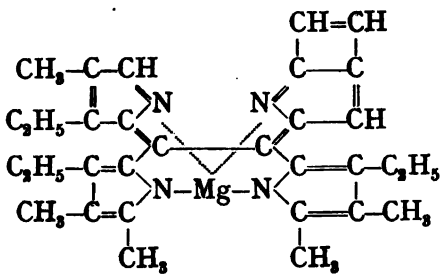
[1]) Vgl. H. Fischer und E. Bartholomäus, Zeitschr. f. physiol. Chem. 83, 50 [1912].

[2]) Ann. d. Chem. 390, 191 [1912].

Lassen wir in diese Grundsubstanz mit Rücksicht auf die Oxydationsprodukte drei Methyl- und drei Äthylgruppen und wegen der Reduktionsprodukte mindestens noch ein Methyl eintreten, so bleibt schließlich für die letzten drei Kohlenstoffatome des Ätioporphyrins nur so viel Wasserstoff übrig, daß entweder zwei Doppelbindungen oder zwei Kohlenstoffringe oder je eines von beiden angenommen werden muß. Wenn wir entsprechend dem Verlauf der Reduktion es vermeiden, einen Cyclopentan- oder hexanring anzunehmen, so gelangen wir mit einiger Wahrscheinlichkeit zu folgenden Formeln für Ätioporphyrin und Ätiophyllin:



Ätioporphyrin $C_{31}H_{36}N_4$.



Ätiophyllin $C_{31}H_{34}N_4Mg$.

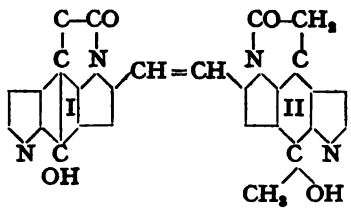
Mehrere Einzelheiten dieser Formel wie die Stellung von zwei Methylen sind willkürlich, auch könnte der Cyclobutenring in β-β-Stellung an das Pyrrol angegliedert sein.

Die Carboxyle des Phyllo- und Pyrroporphyrins substituieren Äthylgruppen; die Formel ist unsymmetrisch genug, um den beobachteten Isomerien der sauren Porphyrine zu genügen.

Versuchen wir nun, die Beziehung zwischen dem Ätioporphyrin

und dem Hämin klarzulegen, so treten uns die Fragen entgegen, welche die ersten Umwandlungen des Hämins noch stellen.

Willstätter und Fritzsche[1]) haben vor vier Jahren darauf aufmerksam gemacht, daß im Hämin gemäß den Versuchen von M. Nencki und J. Zaleski[2]) über die Esterbildung zwei freie Carboxyle existieren; dieser Ansicht hat sich mit gründlichen Beweisen W. Küster[3]) angeschlossen, während O. Piloty an der Annahme festhält, Hämin enthalte die beiden Carboxyle in der Form von Lactamgruppen und die zwei übrigen Sauerstoffatome als Hydroxyle:



Indessen stehen mit dieser Lactamformel schon die Analysen der Dialkylester von Nencki und Zaleski, deren Werte Formeln wie $C_{32}H_{30}(COOCH_3)_2N_4FeCl$ entsprechen, und dann die Oxydation des Dimethylhämins zum Hämatinsäureester nach Küster im Widerspruch.

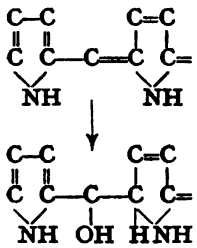
Beim Austritt des Eisens aus dem Hämin erfolgt nach Piloty zugleich die Lösung der angenommenen Lactamgruppen, Hämatoporphyrin wäre danach die eisenfreie, dem Hämin genau entsprechende Verbindung. Dem entgegen betrachtet W. Küster zwei Vinylgruppen im Hämin als Angriffsstelle der Reagenzien, z. B. des Bromwasserstoffeisessigs bei der Eliminierung des Eisens, und H. Fischer[4]) hält es für wahrscheinlich, daß es Doppelbindungen zwischen Methingruppen und Pyrrolkernen sind, die Halogenwasserstoff, also mittelbar Wasser aufnehmen.

Willstätter und M. Fischer haben Versuche über den Verlauf der Hämatoporphyrinbildung angestellt und eine Reihe von Zwischenprodukten aufgefunden, die erkennen lassen, daß zunächst

[1]) Ann. d. Chem. 371, 49 [1909].
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 384 [1900].
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 66, 165 [1910].; Ber. d. deutsch. chem. Ges. 45, 1935 und 2503 [1912]; Zeitschr. f. physiol. Chem. 86, 185 [1913].
[4]) H. Fischer, E. Bartholomäus und H. Röse, Zeitschr. f. physiol. Chem. 84, 262 [1913].

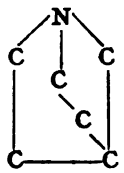
zwei Moleküle Bromwasserstoff addiert werden und daß dabei die Bindung des Eisens bedeutend gelockert wird.

Die Erklärung von H. Fischer ließe erwarten, daß die Farbe der Verbindungen bei den Additionen in Mitleidenschaft gezogen, nämlich abgeschwächt würde:

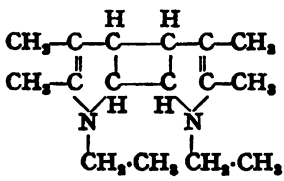


was nicht zutrifft. Nach der Betrachtung von Küster wären es unwichtige, die komplexe Bindung nicht beeinträchtigende Gruppen, an welchen Additionen stattfinden würden.

Zur Erklärung der Reaktionen bei dem Austritt des Eisens erscheint uns die Annahme begründet, daß die Gruppen, die sich durch ihr Additionsbestreben auszeichnen, mit Stickstoffatomen in Verbindung stehen, etwa nach folgendem Schema, für das manche Alkaloide Analogien bieten:

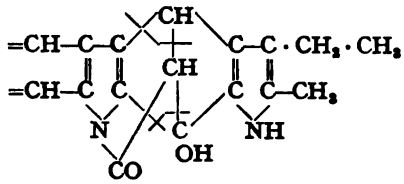


Diese Formel für einen Teil des Häminmoleküls stimmt sehr gut zu einer merkwürdigen, aber noch unsicheren Beobachtung von O. Piloty und J. Stock[1]), die in der Form des Pikrates ein polymerisiertes, wahrscheinlich am Stickstoff äthyliertes Pyrrol, nämlich ein bis-α-β-Dimethyl-N-äthylpyrrol von der Formel:



[1]) Ann. d. Chem. 392, 215 [1912]; siehe dagegen O. Piloty u. K. Wilke, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 46, 1597 [1913].

unter den Hämopyrrolen aufgefunden haben. Daß die Äthylgruppe aus dem als Lactam vorhandenen Carboxyl und einem Kohlenstoffatom des Kohlenstofffünfringes hervorgeht, wie Piloty und Stock annehmen:



ist unwahrscheinlich.

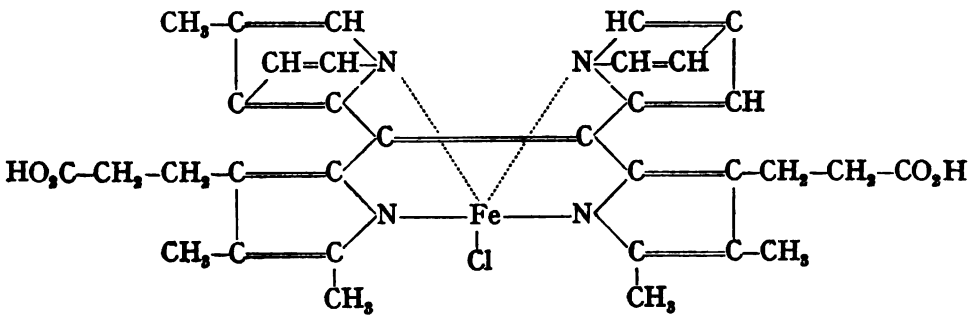
Wenn schon das Ätioporphyrin von der Formel $C_{31}H_{36}N_4$ auffallend wasserstoffarm erscheint, so leitet sich Hämin $C_{32}H_{32}O_4N_4FeCl$ von einer noch um zwei Wasserstoffatome ärmeren Grundsubstanz:

$$C_{31}H_{34}N_4$$

ab, welche die Annahme von Doppelbindungen und Kohlenstoffringen nötig macht.

Auf der Grundlage der angenommenen Verknüpfung von vier Pyrrolen durch die Gruppe

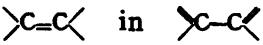
und der Bindung von zwei Vinylen an Stickstoffatome versuchen wir, eine dem Verhalten bei der Oxydation und Reduktion und bei der Porphyrinbildung genügende Konstitutionsformel[1]) des Hämins zu entwickeln, die in mehreren Einzelheiten noch nicht bewiesen ist, aber weitere Untersuchungen, wie wir hoffen, anzuregen vermag:



Hämin $C_{32}H_{32}O_4N_4FeCl$.

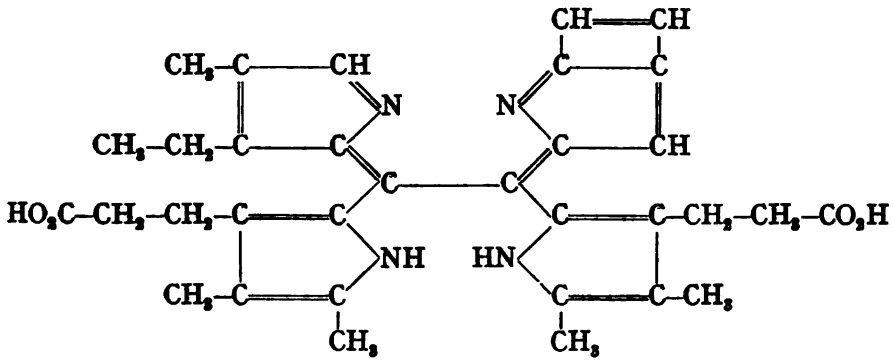
[1]) Aus einer unveröffentlichten Arbeit von Willstätter und M. Fischer.

Bei der Bildung des Hämatoporphyrins werden sich die Brücken von den zwei Pyrrolstickstoffen loslösen, worauf sich die mittlere Gruppe



umwandeln kann.

Bei den Umwandlungen des Hämatoporphyrins soll nach unserer Annahme die Kondensation eines Vinylrestes mit einem Kohlenstoffatom des Pyrrolkernes erfolgen, welche das Strukturbild des Äthioporphyrins zum Ausdruck bringt. Das Hämoporphyrin wird daher durch folgende Formel erklärt:



Hämoporphyrin $C_{28}H_{36}O_4N_4$.

und das möglicherweise um zwei Wasserstoffatome reichere Mesoporphyrin vielleicht durch die entsprechende Formel mit Sättigung der Gruppe CH=CH.

Die Formeln veranschaulichen, daß das Molekül des Hämins sich beim Abbau in unsymmetrischer Weise ändert, worauf mehrere Reaktionen hindeuten. Während bei der Oxydation kein Methyläthylmaleinimid auftritt, liefert[1]) Mesoporphyrin dieses Imid, indessen nicht mehr als ein Molekül.

Eine Voraussetzung unserer Betrachtungen bildet die Annahme der einfachen Molekulargröße von Hämin und Hämatoporphyrin, welche die Formeln mit dreiunddreißig Atomen Kohlenstoff aus-

[1]) H. Fischer und F. Meyer-Betz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 82, 96 [1912] und W. Küster und P. Deihle, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 45, 1935, 1945 [1912] und Zeitschr. f. physiol. Chem. 82, 463 [1912].

drücken. Während unsere Molekulargewichtsbestimmungen[1]) bei zahlreichen Chlorophyllderivaten und J. Zaleskis[2]) Bestimmungen für Mesoporphyrin damit im Einklang stehen, haben O. Piloty und E. Dormann[3]) aus Versuchen über die Siedepunktserhöhung der Pyridinlösung von Hämatoporphyrin den Schluß gezogen: „daß für das Hämatoporphyrin das Doppelte des bisher angenommenen Molekulargewichts als feststehend angenommen werden muß"; diese Folgerung ist von O. Piloty und H. Fink[4]) gestützt und auf Hämin und Hämoglobin ausgedehnt worden. Diese Ergebnisse sind indessen nicht aufrecht zu halten[5]). Mit schön krystallisierter Tetramethylverbindung des Hämatoporphyrins (Dimethylätherdimethylester) finden Willstätter und M. Fischer in Veratrollösung die einfache Molekulargröße bestätigt.

Obwohl nun Chlorophyll und Hämin auf das gleiche Ätioporphyrin zurückgeführt worden sind, das man als eine Stammsubstanz bezeichnen kann, ziehen wir aus den Untersuchungen über den Abbau nicht den Schluß einer nahen, konstitutionellen Verwandtschaft zwischen Chlorophyll und Hämin. Hier Magnesium, dort Eisen, hier Esterbildung mit Phytol, dort Paarung mit Globin; zu solchen der ungleichartigen Funktion entsprechenden Unterschieden kommen noch in dem eigentlichen Farbstoffkern bedeutende Unterschiede, die erst bei tiefgreifendem Abbau verschwunden sind.

Auf dem Wege vom Hämin zum Ätioporphyrin gibt es zwei Verwandlungen, die den Bau des Moleküls wesentlich ändern, nämlich den Übergang vom Hämin zum Hämatoporphyrin und von diesem zum Hämoporphyrin, das mit den Porphyrinen des Chlorophylls isomer ist.

Auch zwischen Chlorophyll und dem Ätiophyllin und sogar zwischen Chlorophyll und den ersten zweibasischen Porphyrinen wie

---

[1]) Ann. d. Chem. 382, 155 [1911].
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 73 [1902].
[3]) Ann. d. Chem. 388, 319 [1912].
[4]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 45, 2495 [1912] und 46, 2020 [1913].
[5]) Entweder war das angewandte Präparat nicht gut oder Hämatoporphyrin verträgt das Sieden mit Pyridin nicht, wie es auch beim Trocknen bei 100° verdirbt.

Cyanoporphyrin oder Erythroporphyrin liegen zwei das Molekül wesentlich umgestaltende Schritte, die sich mit den Reaktionen des Hämins nicht in Parallele bringen lassen.

Der eine Schritt ist die Umlactamisierung der Chlorophyllkomponenten, durch die ein Ringsystem aufgespalten, ein neues synthetisiert wird. Die zweite Umformung des Moleküls, die weniger augenfällig stattfindet, geschieht durch die Einwirkung von Alkali bei höherer Temperatur und führt von den Chlorophyllinen zu den einfacher konstituierten zweibasischen Phyllinen oder vom Phytochlorin und Phytorhodin zu den entsprechenden Porphyrinen.

Die Bildung von Cyanoporphyrin aus Phytochlorin scheint einfach durch Abspaltung eines Carboxyls nach der Gleichung:

$$C_{34}H_{36}O_6N_4 = C_{33}H_{36}O_4N_4 + CO_2$$

zu verlaufen. Aber da die Porphyrine zwar alle einander ähnlich, doch von den Chlorinen und Rhodinen sehr verschieden sind, so ist die Umwandlung wohl eine tiefergehende. Wäre das Lactam im Phytochlorin aus einem das Pyrrol substituierenden Carboxyl und dem Pyrrolstickstoff zusammengesetzt, so könnte die Abspaltung der Kohlensäure die Eigenschaften kaum stark beeinflussen, etwa so wenig wie der Übergang von den zweibasischen zu den einbasischen Porphyrinen. Darum ist es wahrscheinlicher, daß die Lactamgruppe pyridonartig ist, ihr Carboxyl also selbst Ringbestandteil und daß erst durch Austritt eines Kohlenstoffatoms der vierte Pyrrolkern des Cyanoporphyrins entsteht.

Künftige Arbeiten über die Konstitution des Chlorophylls finden daher noch große Aufgaben. Die Beziehungen zwischen den beiden Chlorophyllkomponenten und die Umwandlungen, welche vom Chlorophyll zu den Chlorophyllinen, von den Chlorophyllinen zu den zweibasischen Phyllinen führen, sind aufzuklären und die Struktur des Ätioporphyrins ist noch in wichtigen Einzelheiten zu erforschen.

II. Beschreibung des Blattfarbstoffs in einfachen Versuchen.

Die Extraktion des Chlorophylls, seine Trennung von den begleitenden gelben Pigmenten, seine Isolierung und Gewinnung in der Form schön krystallisierter Derivate, nämlich als Methyl- und Äthylchlorophyllid, und seine Umwandlungen werden in den folgenden Kapiteln behandelt. Auf den dort geschilderten Methoden beruhen einige einfache Versuche, die sich für die Arbeit in kleinem Maßstab, z. B. für die pflanzenphysiologische Vorlesung und das botanische Praktikum eignen mögen. Sie sollen die Abscheidung des Blattfarbstoffs und seine Eigenschaften illustrieren.

Diesen Versuchen liegen folgende Haupttatsachen zugrunde.

Die Chloroplasten enthalten in kolloidalem Zustand gemischt mit farblosen Substanzen vier Pigmente, nämlich zwei einander nahe verwandte Chlorophyllfarbstoffe und zwei gelbe Pigmente:

Chlorophyllkomponente a von der Zusammensetzung $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$, blauschwarz, in Lösung grünblau;

Chlorophyllkomponente b von der Zusammensetzung $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$, grünschwarz, in Lösung rein grün;

Carotin von der Formel $C_{40}H_{56}$, orangerote Krystalle;

Xanthophyll von der Formel $C_{40}H_{56}O_2$, gelbe Krystalle.

Diese Pigmente haben wir in allen untersuchten Pflanzen aus den verschiedenen Klassen identisch gefunden und das Chlorophyll bei der vergleichenden Untersuchung durch seine konstante Zusammensetzung gekennzeichnet:

Es enthält 2,7% Magnesium und gibt eine Asche von reiner Magnesia (ohne Phosphor oder Eisen).

Es liefert bei der Verseifung den stickstofffreien Alkohol Phytol ($C_{20}H_{40}O$) als ein Drittel des Moleküls.

Der stickstoffhaltige Komplex, der vier Pyrrolkerne enthält, wird durch das Spaltungsprodukt Phytochlorin e aus der Komponente a und Phytorhodin g aus der Komponente b identifiziert. Das eine ist in Äther olivgrün, das andere rot.

Frische Blätter enthalten ungefähr 2 Promille Chlorophyll a, $^3/_4$ b, Xanthophyll $^1/_3$, Carotin $^1/_6$ Promille.

Verhalten gegen Lösungsmittel.

Für die Bereitung von Chlorophyllösungen werden in den botanischen Büchern ungeeignete Verfahren angeraten.

1. Versuch. 10 g frische Blätter (Brennesseln) werden mit wenig Seesand in der Reibschale fein zerrieben und auf einen Trichter mit Siebplatte und Filtrierpapierscheibe gebracht. Dann übergießt man den Brei mit 20 ccm Aceton, saugt an der Wasserstrahlpumpe ab und wiederholt Aufgießen und Absaugen des Lösungsmittels. Das Filtrat (ca. 40 ccm) enthält 2 cg Chlorophyll.

2. Versuch. Beim kurzen Eintauchen in siedendes Wasser färbt sich ein Blatt lebhafter grün und der mikroskopische Schnitt zeigt die Chloroplasten zerflossen. Dabei werden die Oxydationsfermente zerstört. Während ein frisches Holunder- oder Roßkastanienblatt beim Verreiben olivbraun wird und beim Extrahieren eine braune Masse hinterläßt, bleibt das abgebrühte Blatt beim Zerkleinern grün und die Blattsubstanz ist nach dem Extrahieren weiß.

3. Versuch. Gepulverte trockene Blätter geben den Farbstoff nicht ab an Benzol und nur sehr träge an absoluten Alkohol, Aceton und Äther, während sie gut extrahiert werden von 80 bis 90prozentigem Alkohol oder Aceton. Petroläther extrahiert das Chlorophyll gar nicht.

4. Versuch. 2 g getrocknete Brennesselblätter werden fein gepulvert und auf einem Nutschentrichter trocken angesaugt. Dann gießen wir 10—20 ccm 85volumprozentiges Aceton (oder 90prozentigen Alkohol) in einzelnen kleinen Anteilen langsam unter zeit-

weisem, schwachem Saugen mit der Pumpe auf und erhalten in einer Minute in dem schön grünen, intensiv rot fluorescierenden Extrakt fast allen Farbstoff.

Wirkungen des Chlorophyllase.

5. Versuch. Chlorophyllasereiche frische Blätter (Heracleum, Galeopsis) legen wir zerkleinert in 70volumprozentiges Aceton ein (1 g in 3 ccm). Aus der Blattsubstanz tritt viel Chlorophyll aus; es wird durch die Wirkung des Enzyms in Phytol und das sauere Chlorophyllid gespalten. Man erkennt dies schon nach einer Viertelstunde, wenn man die Farbstofflösung mit Wasser verdünnt und ausäthert, beim Schütteln der Ätherlösung mit 0,05prozentiger Natronlauge. Sie nimmt desto mehr Farbstoff auf, je vollständiger die Enzymreaktion stattgefunden hat.

6. Versuch. Abgebrühte Blätter derselben chlorophyllasereichen Pflanzen liefern mit wasserhaltigem Aceton unter gleichen Umständen eine Lösung von unversehrtem Chlorophyll, die mit der verdünnten Natronlauge nicht reagiert. Dadurch wird gezeigt, daß die Hydrolyse (und die Alkoholyse) eine Enzymwirkung ist.

7. Versuch. Eine Anzahl mikroskopischer Schnitte eines Heracleumblattes befeuchten wir auf dem Objektträger mit einem Tropfen 90prozentigem Alkohol und legen ein Deckgläschen darauf. Man läßt den Objektträger neben einem Schälchen mit Alkohol unter einer kleinen Glasglocke bis zum Eintrocknen stehen (einen halben bis ganzen Tag). Dann zeigen sich nach Borodin in den Zellen und neben dem Blattgewebe die schönen drei- und sechseckigen Formen des krystallisierten Chlorophylls (Äthylchlorophyllid) (Fig. 7 auf S. 176.)

8. Versuch. 1 g von einem frischen Heracleumblatt übergießen wir im Reagierglas mit 4 ccm 75prozentigem Holzgeist. Das Blatt wird zuerst tiefer grün und dann vergilbt es in 1 bis 3 Stunden. Das austretende Chlorophyll hat das Phytol verloren; das entstandene Methylchlorophyllid bildet schwarze Pünktchen im Blattgewebe, die sich unter dem Mikroskop als glänzende Krystalldrusen erweisen (siehe Fig. 6 auf S. 175).

9. Versuch. 2 g gepulverte trockene Heracleumblätter lassen wir mit 6 ccm 90prozentigem Alkohol im Reagierglas einen halben oder ganzen Tag lang stehen. Dann wird der Extrakt auf einem kleinen Nutschenfilter abgesaugt und das Mehl mit etwas Aceton nachgewaschen. Das Filtrat vermischen wir mit dem gleichen Volumen Äther und mit Wasser, heben die ätherische Lösung des Äthylchlorophyllids im Reagierglastropftrichter (Fig. 1) ab und waschen sie mit Wasser durch. Sie wird im Reagierglas im Wasserbad bis auf $^1/_2$ oder 1 ccm konzentriert und warm mit 3 ccm Petroläther versetzt. Das Chlorophyll fällt beim Stehen in Krystalldrusen aus. Es läßt sich durch Anschütteln mit wenig Äther von gelben Pigmenten befreien und dann aus mehr Äther umkrystallisieren.

Fig. 1. Reagierglastropftrichter.

Merkmale des Chlorophylls.

10. Versuch. Acetonextrakt aus frischen Blättern von Versuch 1 verdünnt man mit dem 5fachen Volumen 85prozentigen Acetons zur Beobachtung des Absorptionsspektrums und verwendet eine Schicht von 1 cm im Glastrog mit parallelen Wänden. Als Lichtquelle dient eine Auerlampe oder Sonnenlicht. Wir empfehlen für die Beobachtung ein Taschenspektroskop mit Gitter und Wellenlängenskala von Fuess in Steglitz.

Das Spektrum zeigt eine Hauptabsorption im Rot bei der Fraunhoferschen Linie C; dann folgen gegen Violett hin mit abnehmender Intensität 3 Absorptionsbänder und ein zweites Absorptionsmaximum, die vollständige Auslöschung der blauen bis violetten Region (Fig. 1 der Tafel I).

Beim Versetzen einer Probe des verdünnten Acetonextraktes mit einem Tropfen Salzsäure schlägt die Farbe des Chlorophylls sofort in Olivbraun um. Der Magnesiumkomplex wird zerstört, das Spektrum des entstandenen Phäophytins weist eine intensive Absorption im Grün vor der Linie E auf (Fig. 2 der Tafel I).

11. Versuch. Eine ätherische Lösung des Blattfarbstoffes bereiten wir aus dem Acetonextrakt trockener Blätter (Versuch 4) durch Eingießen in 30 ccm Äther und Zusatz von 50 ccm Wasser

im Scheidetrichter. Dadurch trennt sich die Ätherschicht ab. Sie wird noch viermal mit je 50 ccm Wasser gewaschen, das man, ohne zu schütteln, der Gefäßwand entlang laufen läßt. Die ätherische Lösung (15 ccm) ist leicht etwas emulsioniert, sie läßt sich durch Schütteln mit wasserfreiem Natriumsulfat und Filtration klären.

Das Chlorophyll als ein Ester zeigt keine sauren Eigenschaften; die ätherische Lösung reagiert nicht mit wässerigen Alkalilaugen bei gelindem Schütteln.

Beim Unterschichten mit 30prozentiger methylalkoholischer Kalilauge zeigt sie die charakteristische braune Phase, die Molisch entdeckt hat. An der Grenzschicht tritt sofort eine Zone von schön brauner Farbe auf, die sich beim Durchschütteln verbreitet. Sie geht in 10 Minuten durch Oliv wieder in rein Grün über. Das Chlorophyll ist zum Kaliumsalz der Säure Chlorophyllin verseift; beim Verdünnen mit Wasser wandert daher die grüne Farbe nicht mehr in den Äther.

12. Versuch. Der Abbau zu Phytochlorin und zu Phytorhodin und die Trennung derselben läßt sich mit 5 ccm der erhaltenen ätherischen Lösung ausführen.

Der Äther wird im Reagierglas abgedampft und der Rückstand mit 3 ccm siedender methylalkoholischer Kalilauge übergossen, die man noch $^1/_2$ Minute über dem Bunsenbrenner gelinde kocht. Die schön rot fluorescierende Kaliumsalzlösung verdünnen wir mit dem doppelten Volumen Wasser und neutralisieren sie mit konzentrierter Salzsäure, bis die Reaktion eben deutlich sauer ist. Die Lösung gibt die gebildeten Spaltungsprodukte beim Ausschütteln im Reagierglasscheidetrichter an Äther mit olivbrauner Farbe ab.

Die Ätherlösung schüttelt man zur Trennung zweimal mit je 10 ccm 4prozentiger Salzsäure durch; die grünblaue Säureschicht liefert beim Neutralisieren mit Ammoniak und Ausäthern die olivgrüne Lösung des aus der Chlorophyllkomponente a hervorgegangenen Phytochlorins e.

Der nach dem Ausziehen mit 4prozentiger Säure hinterbliebene Anteil wird nun einmal mit 10 ccm 12prozentiger Salzsäure extrahiert; die grüne Säurelösung läßt beim Verdünnen mit Wasser

Phytorhodin g, das Derivat der Komponente b, mit roter Farbe in Äther übergehen.

13. Versuch. Von der ätherischen Rohchlorophyllösung schütteln wir 2 ccm mit ein wenig 20prozentiger Salzsäure und dann mit etwas Wasser durch; die abgegossene Ätherlösung des magnesiumfreien Chlorophyllderivats wird im Wasserbad abgedampft und ihr Rückstand mit 5 ccm Alkohol aufgenommen. Die olivfarbige Flüssigkeit nimmt beim Erwärmen mit einem Körnchen Kupferacetat eine prächtige Chlorophyllfarbe an infolge der Bildung einer dem Blattfarbstoff ähnlichen, aber beständigeren Kupferverbindung.

Trennung der Pigmente.

14. Versuch. Von der ätherischen Lösung des Blattfarbstoffs (Versuch 11) schütteln wir 5 ccm kräftig durch mit 2 ccm starker methylalkoholischer Kalilauge. Nach der Wiederkehr der grünen Farbe verdünnt man nach und nach mit 10 ccm Wasser und fügt noch etwas Äther hinzu. Beim Durchschütteln im Reagierglas bilden sich zwei Schichten, von denen die wässerig-alkalische das Chlorophyll und die ätherische die Carotinoide enthält.

15. Versuch. Zur Trennung der beiden gelben Pigmente dient die im vorigen Versuch erhaltene ätherische Schicht. Sie wird abgehoben, mit Wasser gewaschen und auf 1 ccm eingedampft. Dann verdünnen wir sie mit 10 ccm Petroläther und entmischen mit je 10 ccm 90prozentigem Methylalkohol etwa dreimal, bis er sich nicht mehr anfärbt. Im Holzgeist befindet sich Xanthophyll, im Petroläther Carotin. Mit dem Taschengitterspektroskop beobachtet man die in der Fig. 4 der Tafel I dargestellten Absorptionsspektren der gelben Blattfarbstoffe (5 mg in 1 l Äther, Schichtdicke 1 cm).

16. Versuch. Aus einem Viertel des Acetonextraktes von 2 g trockenen Blättern (Versuch 4) führen wir allen Farbstoff in Petroläther über, indem wir ihn im Reagierglastropftrichter mit 10 ccm Petroläther und 20 ccm Wasser entmischen. Wird die mit etwas Wasser gewaschene Petrolätherlösung mit 92prozentigem Methylalkohol (10 ccm) durchgeschüttelt, so geht in diesen Chloro-

phyll b mit Xanthophyll über, während im Petroläther Chlorophyll a und Carotin zurückbleiben.

Die gelben Begleiter vermindern den Farbunterschied zwischen den Chlorophyllkomponenten, deutlich tritt ihre Verschiedenheit in dem Farbumschlag beim Unterschichten mit methylalkoholischer Kalilauge zutage. Um die Probe (wie bei Versuch 11) auszuführen, bringen wir durch Verdünnen und Ausschütteln b wieder in Äther. Die Chlorophyllkomponente a gibt eine gelbe, b eine braunrote Phase.

Die charakteristischen Unterschiede (siehe genauer im Kap. VI) in den Spektren der ganz reinen Chlorophyllkomponenten (Lösung von 0,04 g in einem Liter Äther, Schicht 2 cm) bringt die Fig. 3 der Tafel I zum Ausdruck.

III. Die Extraktion der Farbstoffe.

1. Pflanzenmaterial.

Als Ausgangsmaterial dienen frische und getrocknete Blätter.

Die früheren Autoren haben fast immer frische Pflanzen verarbeitet, nämlich meistens Gras mit Alkohol bei Siedehitze extrahiert[1]). Häufig wird empfohlen, z. B. von R. Sachsse[2]) und von A. Tschirch[3]), die frischen Blätter zuerst mit Wasser auszukochen, sie dann abzupressen und mit warmem Alkohol auszuziehen. F. Hoppe-Seyler[4]) wäscht vor der Extraktion durch kochenden Alkohol das Gras zur Entfernung von Wachs mit Äther.

Eine Angabe über die Verwendung getrockneter Pflanzen findet sich bei A. Hansen[5]), der frisches Gras zuerst in Wasser $^1/_4$ bis $^1/_2$ Stunde auskocht, dann trocknet und ohne Zerkleinerung mit siedendem Alkohol extrahiert.

Wir verwenden für die meisten präparativen Zwecke Blätter in getrocknetem Zustand und gepulverter Form und führen die Extraktion stets bei gewöhnlicher Temperatur aus.

Diese Arbeitsmethode bietet folgende Vorteile:

Viel geringeres Volumen und Gewicht der Blätter, so daß die Verarbeitung in zehnmal kleineren Gefäßen erfolgt.

---

[1]) E. Schunck, Proc. Roy. Soc. 39, 348 [1885] und 44, 448 [1888].

[2]) Phytochem. Untersuchungen. I. Chem. Untersuchungen über Chlorophyll. Leipzig 1880.

[3]) Untersuchungen über das Chlorophyll. Berlin [1884]; ferner Ber. d. d. botan. Ges. 14, 76 [1896].

[4]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 3, 339 [1879].

[5]) Die Farbstoffe des Chlorophylls. Darmstadt [1889]. Seite 46.

Ersparnis an Lösungsmitteln, da diese nicht durch den Wassergehalt der Blätter (70—80% des Frischgewichts) verdünnt werden.

Die Verarbeitung ist von der Jahreszeit und vom Standort der Pflanzen unabhängig.

Die Zerkleinerung ist erleichtert.

Die Verarbeitung der Blattmehle ermöglicht es, die Gewinnung des Chlorophylls und seiner Abbauprodukte auf einen technischen Maßstab zu übertragen und sie macht es leicht, im Laboratorium Mengen darzustellen, wie sie für die chemische Untersuchung erforderlich sind.

Da die Mengen der Präparate nicht mehr einen unbekannten kleinen Bruchteil, sondern den größten Teil des in der Pflanze vorhandenen Chlorophylls darstellen, so werden für die Ausbeuten bei allen präparativen Methoden Angaben mitgeteilt, die früher in der Literatur gänzlich gefehlt haben.

Bei der Trocknung des Pflanzenmaterials sind zwei Nachteile in Betracht zu ziehen: Chlorophyllverlust und Veränderung der Farbstoffe.

Die Verminderung des Farbstoffs macht sich erheblich bemerkbar bei käuflichen Blättern, deren Farbstoffgehalt schwankt je nach der Sorgfalt beim Trocknen und der Witterung in der Sammelzeit.

Während Brennesselblätter (mit Stielen) in frischem Zustand (berechnet auf die Trockensubstanz) 8—10 g Chlorophyll in 1 kg enthalten, pflegt das Chlorophyll des käuflichen Brennesselmehles nur 5—6½ g zu betragen. Die Blattsubstanz mag darin auch durch wertlose Bestandteile der Pflanze verdünnt sein.

Wenn wir die Trocknung selbst ausführen, am besten über dem Dampfkessel oder mit einem Hürdenofen, so wird dabei kein Chlorophyll verloren. Willstätter und Utzinger fanden in alkoholischen Extrakten von getrockneten Brennesseln und Galeopsis 95—96% vom Chlorophyll der frischen Blätter.

Das Trockengewicht der Pflanzen, zumeist (beispielsweise bei Brennesseln) 25% der frischen Blätter, wird beeinflußt von der Jahreszeit und den Wachstumsbedingungen.

Pflanze	Jahreszeit	Wachstumsbedingung	Trockengewicht %
Brennesseln	22. März	—	17,5
Brennesseln	20. Juli	—	34,0
Holunder	12. „ 5h N.	Lichtblätter	27,8
Holunder	11. „ 5h N.	Schattenblätter	16,3
Roßkastanie	17. „ 7h V.	Lichtblätter	37,5
Roßkastanie	17. „ 7h V.	Schattenblätter	25,0
Fichte	21. „	—	50,0

Manche trockne Blätter, z. B. Gras, verderben leicht beim Aufbewahren, andere (Holunder, Nadeln der Coniferen) schon leicht beim Trocknen. Auch solche Blätter haben sich unter Erhaltung des Chlorophylls trocknen lassen durch Aufstellen in Mengen von 50—100 g im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure.

Besonders schwierig waren Braunalgen, z. B. Fucus, unversehrt zu trocknen. Es gelingt auch nach kurzem Abbrühen, Ausschleudern und Ausbreiten im warmen Luftstrom nicht, sie zu einem schön grünen Mehl zu zerkleinern und die Pigmente in guter Ausbeute zu extrahieren.

Der zweite Nachteil, der bei Verwendung getrockneter Blätter möglich ist und von Botanikern oft befürchtet wird, die Veränderung der Pigmente beim Trocknen, tritt nicht leicht ein und läßt sich bei geeigneter Auswahl der Pflanzen und richtiger Trocknung vermeiden.

Wir haben die Merkmale des Chlorophylls bestimmt und bei vergleichenden Versuchen mit frischen und getrockneten Pflanzen übereinstimmend gefunden.

Die Verarbeitung frischer Blätter bleibt wichtig in erster Linie für analytische Zwecke, z. B. bei der raschen Isolierung von reinem Chlorophyll aus kleinen Blattmengen, ferner bei der quantitativen Bestimmung der beiden grünen und der beiden gelben Pigmente.

Eine weitere Bedeutung hat die Verwendung des frischen Materials in dem Falle, wo die Wirkung der Chlorophyllase auf das Chlorophyll ausgenützt wird, also bei der Gewinnung der krystallisierten Chlorophylle. Die Darstellung der freien Chlorophyllide ist sogar bis jetzt nur mit frischen Blättern geglückt, lange Zeit auch die Gewinnung der Methylchlorophyllide. Dann ist die Methode dafür

unter Nachahmung der Arbeitsbedingungen, welche bei frischen Blättern geboten waren, auf die trockenen übertragen worden.

Endlich ist es bei den besonders schwierig zu konservierenden Braunalgen von großem Vorteil gewesen, die Algen in frischem Zustand zur Gewinnung von Fucoxanthin und Chlorophyll zu verwenden.

Die frischen Blätter sind in mancher Hinsicht schwerer als die getrockneten zu verarbeiten, z. B. zu zerkleinern und mitunter vor Veränderungen des Chlorophylls zu schützen. In solchen Fällen hilft eine Vorbehandlung nach Willstätter und Isler[1]) mit wasserhaltigem Methyl- oder Äthylalkohol von solcher Konzentration, daß noch kein Chlorophyll extrahiert wird.

Die Blätter werden entwässert, gehärtet und leicht pulverisierbar. Wir behandeln am besten die Blätter mit so viel wasserfreiem Methylalkohol, daß derselbe durch den Wassergehalt der Blätter ungefähr auf 66 Volumprozent verdünnt wird; dann fügen wir noch weiter 66volumprozentigen Methylalkohol so lange hinzu, bis die mit Steinen mäßig beschwerten Blätter in der Flüssigkeit ganz untergetaucht bleiben. Manchmal ist es zweckmäßig, Mischungen von wasserhaltigem Holzgeist und Äther anzuwenden, wodurch gewissen Pflanzen viel Harz entzogen wird. Auf diese Weise gelingt es vortrefflich, aus den sonst kaum zu verarbeitenden frischen Fichtennadeln schöne Chlorophyllösungen herzustellen, indem wir z. B. 800 g Fichtennadeln mit 1500 ccm Methylalkohol, 900 ccm Wasser und 600 ccm Äther behandeln.

Nach dieser Behandlung läßt sich das Chlorophyll noch leichter als sonst extrahieren, und bei richtig bemessener Dauer wird die Ausbeute durchwegs gut.

Pflanze	Dauer der Behandlung	Chlorophyll in g aus 1 kg frischer Blätter
Brennessel	1—18 Stunden	2,1—1,6
Fichtennadeln	2 „	0,9
Schachtelhalm	18 „	1,4
Farnkraut	2 „	1,5
Laubmoos	16 „	1,4

[1]) Ann. d. Chem. 380, 171 [1911]; vgl. auch Kap. VII, Abschn. 3.

Die Behandlung in wasserhaltigem Holzgeist ist auch für das Mehl trockener Blätter anwendbar, um ebenfalls das Chlorophyll leichter extrahierbar zu machen.

Pflanzenarten. Bei der Auswahl der Pflanzen unterscheiden wir zwischen den an Chlorophyllase reichen, die sich allein für die Gewinnung von krystallisiertem Chlorophyll eignen, nämlich:

Heracleum spondylium, Galeopsis tetrahit, Stachys silvatica,

und den an Chlorophyllase armen, die für die meisten präparativen Zwecke den Vorzug verdienen: für die Gewinnung von Chlorophyll, Phäophytin, Phytol, Chlorophyllinsalzen und weiteren Abbauprodukten.

Wir verwenden meistens Brennesseln, weil sie billig, chlorophyllreich und enzymarm sind, sich gut trocknen lassen und beim Aufbewahren grün bleiben. Für die Darstellung von Reinchlorophyll finden wir es vorteilhaft, die Trocknung selbst vorzunehmen, weil chlorophyllreiches Material abgesehen von besserer Ausbeute auch einen günstigeren Reinheitsgrad erzielen läßt. Für die Gewinnung von Phäophytin ist das käufliche Brennesselkraut gut genug, das als mittelfeines Mehl zum Preise von 65—80 Mark für 100 kg käuflich ist. Es pflegt nur 7% Feuchtigkeit zu enthalten.

Die Verwendung der Brennessel läßt sich zurückverfolgen bis auf G. G. Stokes[1]), der in seiner berühmten Abhandlung vom Jahre 1852: „On the Change of Refrangibility of Light", aber an keiner späteren Stelle mehr, darüber schrieb:

„A good number of the following observations on the internal dispersion of leaf-green were made with a solution obtained from the leaves of the common nettle, by first boiling them in water and then treating them with cold alcohol, the leaves having previously been partially dried by pressing them between sheets of blotting paper. Nettle was chosen partly because it stands boiling without losing its green colour, and partly for other reasons."

Die Brennesseln haben allerdings einen Nachteil, daß nämlich das Chlorophyll in ihrem Extrakte so leicht wie kaum in dem von

[1]) Edinburgh Transactions 12, 486 [1852].

anderen Pflanzen sich derart verändert, daß beim Abbau schwach basische Spaltungsprodukte statt der normalen auftreten. Diese Veränderung vermeiden wir durch rasches Extrahieren und sofortiges Verarbeiten.

Beispiel. 500 g Brennesselmehl wurde nach dem Nutschenverfahren mit 95prozentigem Alkohol kurz extrahiert. Die Hälfte des Filtrats ist 2—5 Tage lang im Dunkeln oder am Licht aufgestellt worden. Die Verarbeitung auf Phäophytin und seine Verseifung ergab neben dem Phytochlorin e viel Phytochlorin f; das Phytorhodin g trat zurück.

Die zweite Hälfte des Brennesselextraktes blieb mit dem ausgezogenen Mehl der ganzen Portion vermischt ebenso lange stehen. Dann führte der Abbau zum normalen Gemisch von Chlorin e und Rhodin g ohne schwächer basische Begleiter.

2. Methoden der Extraktion.

a) Zustand und Verhalten des Chlorophylls in den Blättern.

Unsere hauptsächliche Änderung gegenüber der üblichen Arbeitsweise früherer Autoren besteht im Extrahieren in der Kälte, wofür sich das Mehl der trockenen Blätter eignet.

Die zur Extraktion anwendbaren Lösungsmittel sind: Alkohol, Methylalkohol, Äther, Aceton.

Die Anwendung ist durchaus nicht allein bedingt durch die Löslichkeit des Chlorophylls. Dieses ist, wie wir jetzt wissen, in reinem Zustand leicht löslich in Benzol und in wasserfreiem Aceton, aber nicht damit extrahierbar. Es ist in Petroläther leicht löslich, solange es mit Begleitstoffen vermischt ist, dennoch ist es damit gar nicht zu extrahieren.

Das trockene Blattmehl wird von absolutem Alkohol nur langsam extrahiert, von Äther und von Chloroform wie von Aceton sehr träge, von Benzol, Petroläther und Schwefelkohlenstoff gar nicht, dagegen sofort von Methylalkohol.

Von der Extraktion mit Lösungsmitteln, die kein Chlorophyll aufnehmen, Petroläther, Benzol und Schwefelkohlenstoff, haben

Willstätter und Mieg zum erstenmal zur Isolierung von Carotin Anwendung gemacht[1]), später hat uns das Verfahren einige Zeit dazu gedient, um durch Beseitigung einer größeren Menge von farblosen und gelben Begleitern reinere Chlorophyllösungen zu bereiten. Den Nutzen dieser Vorbehandlung für den Reinheitsgrad der Chlorophyllextrakte darf man allerdings nicht nach der Menge des Weggelösten bewerten; vielmehr zeigt sich die Wirkung der Vorextraktion erst an petrolätherischen Chlorophyllösungen, welche beim Entmischen der Extrakte mit Petroläther erhalten werden. Die für die Vorbehandlung geeigneten Lösungsmittel entziehen dem Brennesselmehl pro Kilogramm ungefähr 17 g Extraktstoff.

Beispiel. 1 kg Brennesseln, bei 40° getrocknet, wurden auf der Nutsche rasch mit mehreren Lösungsmitteln extrahiert und jedes vom folgenden vollständig verdrängt.

1. 2 l wasserfreien Acetons lösten 0,9—1 g Chlorophyll und gaben 15,4 g Rückstand.
2. 6 l Benzol gaben 3,5 g Rückstand.
3. 1 l Äther löste 0,05 g Chlorophyll und enthielt 0,8 g Rückstand.
4. Petroläther: fast ohne Wirkung.
5. 1 l wasserfreien Acetons nahm 0,15 g Chlorophyll auf, viel Gelbes, gab 1,65 g Rückstand.

Die Verarbeitung mit wasserhaltigem Aceton lieferte dann 4,7 g Reinchlorophyll.

Das eigentümliche Verhalten des Chlorophylls im Blatt gegenüber den Lösungsmitteln haben wir früher durch die Annahme zu erklären versucht, daß das Chlorophyll sich in der Blattsubstanz wahrscheinlich in der Form von Adsorptionsverbindungen mit Kolloiden befinde; ähnlich hat A. Arnaud[2]) angenommen, daß es durch Capillarkräfte im Blattgewebe zurückgehalten werde, und M. Tswett[3]), daß der Farbstoff an das Skelett der Chloroplasten durch molekulare Adsorptionskräfte gebunden sei.

Unsere Beobachtungen sprechen nicht für die auf das Verhalten der Blätter gegen Petroläther gegründete Annahme von

---

[1]) Ann. d. Chem. 355, 12 [1907].
[2]) C. r. 100, 751 [1885].
[3]) Arbeiten der Naturf. Ges. Kasan 35, 86 [1901].

W. Palladin[1]), daß das Chlorophyll in chemisch gebundenem Zustand, nämlich mit Phosphatiden (Lipoiden) verbunden in den Blättern enthalten sei. Wir können Lösungen von Chlorophyll entfärben durch Tierkohle und auch mit Hilfe extrahierter Pflanzenmehle und der Farbstoff befindet sich dann in der Form eines Adsorptionsproduktes, das z. B. von Petroläther nicht angegriffen wird. Es ist sogar schwer, aus der Tierkohle wieder Chlorophyll zu extrahieren; mit Pyridin gelingt es.

Die Anwendung der Lösungsmittel zur Extraktion von Blattgrün wäre also zu erklären durch ihre dissoziierende Kraft, mit der sie auf die Adsorptionsprodukte wirken.

Neue Versuche lassen uns eine andere Auffassung über den Zustand des Chlorophylls im Blattgewebe vorziehen.

Sämtliche Absorptionsstreifen im Spektrum des lebenden Blattes sind nach M. Tswett[2]) und nach älteren Autoren gegenüber dem Spektrum eines Chlorophyllextraktes nach der schwächer gebrochenen Seite hin verschoben. D. Iwanowski[3]) hat die Spektren von Blättern und von kolloidalen Chlorophyllösungen verglichen. Er findet die beiden zwar ähnlich, aber nicht identisch, und nimmt das Chlorophyll im Blatte nicht als kolloidal gelöst, sondern als fein suspendiert an. A. Herlitzka[4]) weist dagegen die Übereinstimmung der Spektren lebender Blätter mit denjenigen kolloidaler Chlorophylllösungen nach und ihren gemeinsamen Unterschied gegenüber wirklichen Chlorophyllösungen; er schließt daraus, wenn auch nicht auf die Identität, so doch auf die Ähnlichkeit des Zustandes von Chlorophyll im Blattgewebe und in der kolloidalen Lösung.

Unsere eigenen Versuche bestätigen ungefähr die Ergebnisse von A. Herlitzka; wir haben die Spektren von Blättern verschiedener Pflanzen gemessen und finden sie in der Lage der

---

[1]) Biochem. Zeitschr. **26**, 357 [1910] und Ber. d. d. bot. Ges. **28**, 120 [1910].

[2]) Die Chromophylle in der Pflanzen- und Tierwelt, S. 173. Warschau [1910].

[3]) Ber. d. d. bot. Ges. **25**, 416 [1908] und Biochem. Zeitschr. **48**, 328 [1913].

[4]) Biochem. Zeitschr. **38**, 321 [1912].

Absorptionsstreifen mit dem Spektrum einer kolloidalen Lösung von reinem Chlorophyll a (Kap. VI, Abschn. 4) identisch, obschon sie in den Intensitätsverhältnissen der Bänder etwas differieren.

Diese spektroskopischen Messungen und namentlich Beobachtungen über das Verhalten der Blätter gegen Lösungsmittel machen es wahrscheinlich, daß das Chlorophyll im Blatte in kolloidaler Verteilung oder einem sehr ähnlichen Zustand vorhanden ist.

Dieser Zustand des Chlorophylls wird in eigentümlicher Weise durch Abbrühen der Blätter beeinflußt; das Chlorophyll wird danach leichter extrahiert.

Während das normale Blattgewebe die Chloroplasten längs der Zellwände schön angeordnet enthält, dichter in den Pallisadenzellen, zerstreuter im Schwammparenchym und zwar in scharf begrenzten, meist elliptischen Formen, zeigen die Blätter nach kurzer Einwirkung von siedendem Wasser die Chloroplasten stark deformiert oder geplatzt, so daß dann ihre etwas körnigen Massen ineinanderfließen und die Zellen diffus erfüllen. Das Zerfließen tritt fast augenblicklich ein. Die Blätter färben sich beim Eintauchen in siedendes Wasser in wenigen Sekunden tief grün, was am schönsten bei Braunalgen zu sehen ist.

Spektroskopisch erweist sich diese Farbänderung der Blätter als eine Verschiebung der Absorptionsstreifen gegen das violette Ende des Spektrums hin; ihre Lage nähert sich etwas der beim Spektrum eines Chlorophyllauszuges beobachteten und ist wenig verschieden von der Lage der Streifen, die eine Lösung von Chlorophyllgemisch in Phytol aufweist.

Das Chlorophyll ist aus seinem kolloidalen Zustand in die Form einer wirklichen Lösung übergegangen, nämlich gelöst in seinen infolge der Temperaturerhöhung verflüssigten wachsartigen Begleitstoffen. Es ist leichtlöslich geworden, sogar Benzol extrahiert aus dem Mehl von abgebrühten Blättern den Farbstoff leicht.

Beim Abbrühen der Blätter geht das Chlorophyll in einem stark brechenden Medium in Lösung. Es gelingt innerhalb des Blattgewebes auch eine Chlorophyllösung mit denselben Solvenzien, wie sie für die Extraktion verwendet werden, zu erzeugen. Wir legen ein Blatt z. B. von Brennesseln in Aceton, bis es gleichmäßig

tiefgrün erscheint und noch kein Chlorophyll aus den Zellen austritt (siehe Kap. VII, Abschn. 2); die spektroskopische Messung ergibt dann Werte, die nach Lage und Intensität der Bänder mit denen des Extraktspektrums zusammenfallen.

Einige unserer spektroskopischen Beobachtungen haben wir in der folgenden Tabelle zusammengestellt; wir durchleuchteten bei den aufgeführten Messungen Brennesselblätter mittels Nernstlampe und Sammellinse unmittelbar vor dem 0,1 mm breiten Spalt eines Zeißschen Gitterspektroskops.

Schicht in mm	Lebendes Blatt	Abgebrühtes Blatt	Lösung von Chlorophyll in Phytol	Mit Aceton behandeltes Blatt
Band I	693—663	686—657	685—654	680—640
„ II	..643	..645	...641	625...601
„ III	625 | 611	623 | 608	625..603	
„ IV	592.569	590.569	590..570	588..564
„ V	551.535	550 | 535	548.532	548.526
„ VI	520...505—	519...505—	512 | 486	514...502—
Endabsorption			...480—	

Diese vergleichende Messung erklärt vollkommen den Zustand und die optischen Verhältnisse des Chlorophylls im lebenden Blatte, sowie in dem mit heißem Wasser oder mit Lösungsmitteln behandelten und lebhafter grün gewordenen Blatte.

Bei dem Lagern der Blätter im Eisschrank tritt keine im mikroskopischen Schnitt sichtbare Veränderung der Chloroplasten ein; aber die Blätter weisen beim Einlegen in wasserhaltigen Methylalkohol ein anderes Verhalten auf als frisch gepflückte, sie entfärben sich rascher, z. B. Brennesselblätter in 5, anstatt in 21 Stunden.

Dies ist eine Behandlung der Blätter[1]), bei der das Chlorophyll aus den Chloroplasten heraustritt und sich an anderer Stelle im Blatte niederschlägt; wahrscheinlich bildet das Lösungsmittel mit den Begleitstoffen des Chlorophylls zunächst eine Mischung, welche auf das Pigment gut lösend einwirkt und es dann bei zunehmender Verdünnung durch das Lösungsmittel wieder ausscheidet.

[1]) Vgl. Kap. VII, Abschn. 2.

Das Mehl der nach dem Lagern im Eisschrank getrockneten Brennesselblätter gibt das Chlorophyll zwar nicht an Petroläther, aber leicht ab an Benzol, so daß es aus der entstehenden Lösung mit Petroläther gefällt werden kann; auch absoluter Alkohol, wasserfreies Aceton und Äther extrahieren daraus den Farbstoff sehr leicht, und Petroläther schon mit einem ungewöhnlich kleinen Zusatz von Alkohol.

Die Ursache der Erscheinung ist noch nicht aufgeklärt; vielleicht beruht sie auf einer Veränderung der Kolloide in den Chloroplasten infolge von Konzentrationsänderungen durch Austritt von Wasser aus den Zellbestandteilen.

Die Schwerlöslichkeit des in der unversehrten Blattsubstanz enthaltenen Chlorophylls und sein Leichtlöslichwerden unter den angegebenen Umständen schienen darauf hinzudeuten, daß das Chlorophyll sich vielleicht im Zustand einer lockern chemischen Bindung im Blatt befinde, aber es ist uns nicht möglich gewesen, für eine solche Vermutung eine Stütze zu finden.

Bei dem raschen Extrahieren und Isolieren aus frischen Blättern, andererseits bei der Verarbeitung von abgebrühten und von den in der Kälte gelagerten Blättern erhält man das Chlorophyll nicht mit irgend einem Unterschied in den Löslichkeitsverhältnissen oder optischen Eigenschaften.

Eine gute Erklärung bietet uns die Annahme eines kolloidalen Zustandes des Chlorophylls im Blattgewebe für die merkwürdigen Löslichkeitsverhältnisse des Farbstoffes beim Behandeln des Blattmehles mit wasserfreien Lösungsmitteln und andererseits bei Gegenwart von Wasser.

Trockenes Mehl von Brennesselblättern färbt Aceton während einer halben Stunde nicht an, sofort und intensiv bei Gegenwart von etwas Wasser; absoluter Alkohol verhält sich ähnlich, der Unterschied ist aber hier kleiner. Methylalkohol zeigt das umgekehrte Verhalten, er löst wasserhaltig schlechter, wasserfrei sofort und gut. Äther und Benzol werden vom Blattmehl nicht angefärbt; sie bleiben in fünf Minuten noch frei von Chlorophyll, befeuchtet man aber das Mehl mit ein paar Tröpfchen Wasser, so färbt sich der Äther sofort stark grün an, das Benzol ähnlich, doch etwas langsamer.

Kolloidale wässerige Chlorophyllösungen geben, sowohl aus Extrakten[1]) wie aus reinen Präparaten bereitet, an Äther oder Benzol beim Durchschütteln kein Chlorophyll ab, sofort aber die ganze Menge bei Zusatz von wenig Salz, z. B. von Chlorcalcium.

Ähnlich denken wir uns das Verhalten des Chlorophylls im Blattmehl. Das zum organischen Lösungsmittel zugesetzte Wasser löst aus der Blattsubstanz Mineralsalze, wie z. B. Kaliumnitrat. Die entstehende Salzlösung verändert den kolloidalen Zustand des Chlorophylls in den Chloroplasten und macht es leichtlöslich.

Dieser Umstand ist von großer Bedeutung bei der Extraktion der Farbstoffe aus getrockneten Blättern mittels der wasserhaltigen Lösungsmittel.

b) Unsere älteren Methoden.

Die Extrakte werden definiert durch ihren Gehalt an Chlorophyll und durch seinen Reinheitsgrad[2]). Wir bezeichnen so das in Prozenten ausgedrückte Verhältnis des Chlorophylls zur Gesamtmenge der Substanz, meistens der gelösten Stoffe. Mittels dieses Wertes wird der Einfluß der Darstellungsweise und der Reinigungsoperationen auf die Trennung des Chlorophylls von den farblosen und gelben Begleitern geprüft.

Den Reinheitsgrad der Lösungen leiten wir ab aus dem colorimetrisch ermittelten Chlorophyllgehalt und dem Trockenrückstand, den wir durch Abdampfen im Wasserbad und Erwärmen im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz bestimmen; bei Mengen von 1 bis 2 g wird sie meist in $^1/_2$—$^3/_4$ Stunden erreicht.

In den Rohchlorophyllösungen sind außer den grünen die gelben Pigmente der Blätter, sowie Fette, Wachse, Phytosterin, Kohlenwasserstoffe, Salze (z. B. Kaliumnitrat), und andere farblose Substanzen enthalten. Der trockene Rückstand eines Extraktes aus 1 kg Brennesseln beträgt 30 bis über 40 g; Lösungen von so geringer Konzentration liefern einen im Vakuum sich aufblähenden, harzigen, mißfarbigen Rückstand, während hochprozentige einen spröden, blauschwarzen Rückstand geben, der sich nach dem Trocknen leicht mit schön grüner Farbe löst.

[1]) Abh. II.

[2]) Ann. d. Chem. 380, 184 [1911].

Flaschenextrakte.

1 kg Blattmehl wird mit 2 l Sprit in der Stöpselflasche extrahiert, was beim Schütteln an der Maschine höchstens einige Stunden beansprucht. Der Extrakt wird an der Pumpe abgesaugt, das Pulver auf der Nutsche scharf abgepreßt und so lange nachgewaschen, bis das Volumen des Filtrates den angewandten zwei Litern gleichkommt.

Bei präparativen Arbeiten im größeren Maßstab stellen wir stärkere Extrakte dar, sogenannte Doppelextrakte, indem die alkoholischen oder ätherischen Auszüge aufs neue zum Erschöpfen von Blattpulver dienen.

Doppelextrakte[1]). Je 50 kg mittelfeines Mehl aus trockenem Brennesselkraut oder Gras schüttelten wir mit 75 l Alkohol von 96% in einem Dutzend 12 l-Pulverflaschen zu einem gleichmäßigen Brei an. Die Extraktion war nach 24stündigem Stehen beendigt, namentlich wenn die Füllung durch häufiges Rollen der Flaschen auf einer dicken Filzunterlage und durch wiederholtes kräftiges Durchschütteln recht gründlich vermischt worden war. Die Lösung wurde dann in drei Portionen an der Pumpe scharf abgesaugt auf einer großen Nutsche aus Steinzeug, die man mit einer Platte zudeckte. Da das abgepreßte Pulver pro Kilogramm durchschnittlich 0,8 l Extrakt zurückhält, war zur Gewinnung des Extraktes Nachwaschen mit 40 l Alkohol erforderlich; der Waschalkohol verdrängte den Extrakt aus dem Pulver, ohne ihn zu verdünnen. So wurden 75 l einfachen Extraktes erhalten. Um das Pulver vollkommen auszulaugen, diente dann ein zweites Nachwaschen mit etwa 20 l Alkohol; dieser Waschalkohol lieferte noch eine sehr verdünnte Chlorophyllösung, die einfach zum Ansetzen von frischem Pulver Verwendung fand.

Mit diesem ersten Extrakt wurde eine zweite Charge von 50 kg Brennesselpulver ausgezogen, und zwar in etwa 48 Stunden. Das Absaugen und Nachwaschen erfolgte in der nämlichen Weise, nur war es lohnend, für das letzte Nachwaschen des Doppelextraktes die doppelte Menge Alkohol anzuwenden, also etwa 40 l. Wir er-

[1]) Ann. d. Chem. 350, 65 [1906].

hielten demnach aus 100 kg Blätter mit 155 l Alkohol 75 l Doppelextrakt, und weitere 60 l Waschalkohol wurden chlorophyllhaltig wiedergewonnen und zur Darstellung des nächsten Extraktes verwendet.

Perkolate[1]).

Wir verwenden gläserne Perkolatoren[2]) von $^1/_2$ und 1 l Inhalt bis zu solchen von 12 und 25 l Inhalt. Die Fig. 2 zeigt die Perkolation mit vier Apparaten von je 25 l Inhalt, und zwar in der Phase des Macerierens.

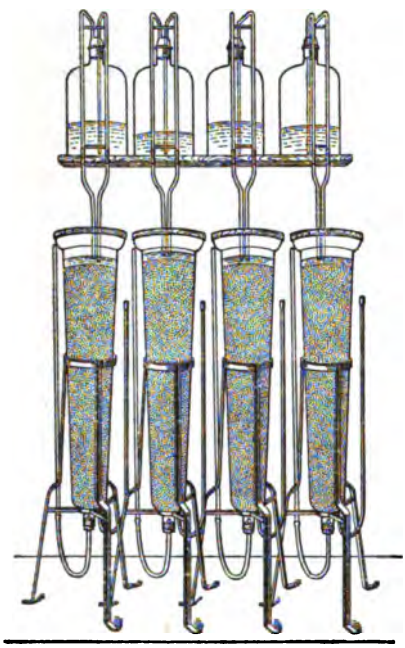


Fig. 2.

Größere Perkolatoren aus Steinzeug sind haltbarer und billiger als die gläsernen Apparate, aber sie sind wegen ihres bedeutenden Gewichtes schwer zu handhaben.

Vor dem Einfüllen des Pflanzenpulvers in die Perkolatoren wird das trockene Mehl mit Alkohol (0,3 l pro Kilogramm) angefeuchtet und gut vermischt in hölzernen Bottichen 3—4 Stunden lang zugedeckt stehen gelassen. Nach dieser Zeit läßt man das Pulver durch ein Roßhaarsieb von ca. 1,5 mm Maschenweite fallen und füllt es in die Perkolatoren ein. Der Boden der Gefäße wird zunächst mit einer dünnen Schicht Watte bedeckt, die als Filter wirkt. Das Material muß ziemlich lose, aber möglichst gleichmäßig eingefüllt und leicht gestampft werden. Ist es zu fest gedrückt, so tritt leicht Verstopfung ein; andererseits, wenn die Füllung ungleichmäßig und zu locker hergestellt ist, findet der Alkohol Kanäle, durch welche er ohne zu extrahieren abläuft. Die untere Grenze des herab-

[1]) R. Willstätter, Chlorophyll in E. Abderhaldens Handbuch der biochem. Arbeitsmethoden 2, 674 [1910]; ferner Ann. d. Chem. 378, 5 [1910].

[2]) Die Perkolatoren sind zu beziehen von den Glashüttenwerken von Poncet, Aktiengesellschaft, Berlin.

sickernden Lösungsmittels soll einen fast horizontalen Kreis bilden.

Zur Perkolation und zum Nachwaschen dienen ca. 2 l Alkohol pro Kilogramm Brennesselpulver. Bei den Perkolatoren mit 3 kg Füllung (10—12 l Wasserinhalt) wird einfach eine Flasche mit 6 l Inhalt umgestülpt und auf den oberen Rand des Perkolators gesetzt; sie entleert sich in dem Maße, als der Alkohol nach unten abfließt. Für die großen Perkolatoren (gefüllt mit ca. 10 kg Brennesseln) werden Flaschen mit je 17 l Alkohol hoch aufgestellt. Sie tragen aufgeschliffene Helme, eine Glasröhre geht durch den Helm fast bis auf den Boden der Flasche, eine zweite Röhre mündet im Helme; beide führen in den Perkolator, bis dicht über die Füllung; auf diese Weise wird der Zufluß von Alkohol automatisch reguliert. Den Perkolator verschließt man zur Vermeidung der Feuchtigkeitsanziehung mit einer geschliffenen Glasplatte, die mit einem Schlitz versehen ist.

Gewöhnlich dauert es 12—15 Stunden, bis die ganze Füllung der großen Perkolatoren von Alkohol durchdrungen ist; wir setzen dann das Macerieren gewöhnlich nicht weiter fort, sondern lassen das Perkolat in eine Flasche übertropfen oder saugen es ab. Anfangs ist der Ablauf höchst konzentriert, er wird immer verdünnter und es ist zweckmäßig, die Vorlage zu wechseln, wenn aus den großen Perkolatoren 0,6—0,7 l Auszug pro Kilogramm Material abgelaufen ist, d. i. ungefähr nach 24 Stunden. In die zweite Vorlage wird unter Saugen in 8—10 Stunden noch ein Nachlauf geleitet, welcher pro Kilogramm Pflanzenmehl 0,30—0,45 l beträgt. Dieser Nachlauf dient zum Ansetzen der nächsten Charge.

Beispiel. Die Charge von 36 kg Pulver wird maceriert mit 10 l Alkohol und in den 4 Apparaten perkoliert mit 16 l Nachlauf und 47 l frischem Sprit; in die I. Vorlage fließen 23 l Perkolat freiwillig ab, in die Vorlage II werden 16 l Nachlauf abgesaugt. Das Mehl hält 34 l Alkohol zurück, die man daraus abdestillieren kann.

Die Extraktion von Chlorophyll mittels der Perkolatoren behält Wert auch gegenüber den verschiedenen Verbesserungen in der Methode, die im Abschnitt d beschrieben werden.

Erstes Nutschenverfahren.

Die langsame Extraktion in Flaschen und in Perkolatoren bietet zwei Nachteile:

1. Die Alkoholyse unter der Wirkung der Chlorophyllase bedingt einen Verlust an Phytol, der auch bei Brennesseln, obwohl sie zu den an Enzym armen Pflanzen zählen, nicht unerheblich ist.

Die Phytolzahl für Brennessel war bei langsamer Extraktion im Mittel der Bestimmungen von 12 Präparaten 28,2, hingegen bei rascher Extraktion 32,2.

2. Bei längerem Stehen der Lösungen verändert sich das Chlorophyll, besonders leicht in Brennesselextrakten, derart, daß die Spaltung des Phäophytins an Stelle des normalen Phytochlorins e das schwächer basische Phytochlorin f ergibt.

Es ist daher geboten, ein abgekürztes Verfahren der Extraktion anzuwenden, nämlich das Ausziehen des Pulvers direkt auf der Nutsche.

1 kg Galeopsismehl wird in einer Porzellanschale während 5 Minuten mit 0,5 l Alkohol (96prozentig) angefeuchtet, gleichmäßig bearbeitet und dann auf die Nutsche dicht aufgeschichtet. Hierauf gießt man 0,5 l Alkohol auf und beginnt mit dem Maschinenvakuum kurz anzusaugen. Endlich wird unter abwechselndem Zugießen und Absaugen noch etwa 1 l Alkohol nachgefüllt. In 20 Minuten, vom Beginn des Anfeuchtens gerechnet, ist 1 l Extrakt abgeflossen, 5 g Chlorophyll enthaltend.

Bei präparativem Arbeiten hat dieses Nutschenverfahren den Nachteil geringerer Ausbeuten, sie wachsen mit der Zeitdauer der Extraktion; wir gewinnen z. B. aus 1 kg Brennesselmehl beim Ausziehen auf der Nutsche folgende Ausbeuten:

Extraktionszeit	Extrakt in ccm	Chlorophyll in g
15 Min.	700	2,9
19 „	800	3,3
25 „	850	3,7
120 „	800	4,4
3 Tage	6000	7,1 (Quantitat. Extrakt)

Daher arbeiten wir am besten auf der Nutsche mit einer Extraktionsdauer von 2—3 Stunden für die Charge von 2 kg. Die Menge des Lösungsmittels braucht dabei nicht größer zu sein als

bei der Herstellung von Doppelextrakten, wir reichen aus mit 1,5 l pro Kilogramm Mehl.

Beim Arbeiten mit dem Perkolator muß man zwischen Vorextraktion und Extraktion das Material wieder trocknen; diese umständliche und für das Chlorophyll ungünstige Operation läßt sich nicht umgehen, weil sonst beim Extrahieren der durch die Vorbehandlung kompakter gewordenen Blattsubstanz Verstopfung eintritt. Auf der Nutsche lassen sich hingegen Vorextraktion und Extraktion einfach verbinden; diese Extraktionsmethode bietet daher, abgesehen von ihrer Einfachheit, besonderen Vorteil bei der Kombination der Vorextraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln und der Extraktion mit Alkohol.

Bei der Arbeit in größerem Maßstab füllen wir einfacher das Blattpulver, ohne es zuvor mit Alkohol anzufeuchten, in die Nutsche ein. Unter stetem Saugen mit dem Maschinenvakuum wird das Mehl gleichmäßig auf der Nutsche verteilt. Bei einiger Übung und sorgfältigem Arbeiten gelingt es, auch eine große Steinzeugnutsche mit 20 kg Pulver zu füllen, ohne daß bei der Extraktion Unregelmäßigkeiten vorkommen.

Auf den Reinheitsgrad des Chlorophylls üben, wie die folgenden Beobachtungen zeigen, Extraktionsmethode und Extraktionsdauer nur wenig Einfluß aus, weniger als Verschiedenheiten der Ernten.

Extraktion von 1 kg käufl. Brennesselmehl	Extraktionszeit	Extrakt in ccm	Rückstand in g	Reinheitsgrad	Chlorophyll in g
1. Perkolate:					
a) lang	48 Stunden	1000	33,6	16	5,5
b) kurz, 1. Abfluß	1 Stunde	120	4,9	12	0,6
c) kurz, 2. Abfluß	2 Stunden	220	12,3	12	1,5
2. Flaschenextrakte:					
a) Doppelextrakte.	48 Stunden	1060	34,8	16	5,5
b) einf. Extrakte .	48 Stunden	1600	46,6	13	6,2
c) rasche Extrakte	10 Minuten	1300	22,0	13	2,8
d) rasch. Extrakte	30 Minuten	1600	21,6	16	3,5
3. Nutschenextrakte:					
a) rasch	15 Minuten	500	12,5	17	2,1
b) mäßig rasch . .	2 Stunden	800	31,4	14	4,4

Am günstigsten für den Reinheitsgrad des Chlorophylls wirkt die Vorbehandlung mit Benzol, weniger günstig die mit Petroläther;

da aber für die Isolierung des Chlorophylls die petrolätherische Lösung frei von Benzol sein muß, verdrängen wir bei der Vorextraktion das Benzol aus dem Blattmehl durch Petroläther. Dafür waren pro Kilogramm Brennesseln 3 l Benzol und 1—1½ l Petroläther erforderlich und die Behandlung beanspruchte für eine Charge von 2 kg 2—3 Stunden.

Den Gewinn für den Reinheitsgrad des in Petroläther übergeführten Chlorophylls zeigt die folgende Tabelle. Die Versuche 1 bis 4 beziehen sich auf die petrolätherische Rohchlorophyllösung, Nummer 5 auf diese Lösung nach einmaligem Waschen mit ½ Volumen 90prozentigem Holzgeist. Die Zahlen von Nr. 5 sind Mittelwerte aus 4 Versuchen.

Nummer	Vorextraktion	Extrakt	Extrakt			Petrolätherische Chlorophyllösung		
			Chlorophyll in g	Rückstand in g	Reinheitsgrad	Chlorophyll in g	Rückstand in g	Reinheitsgrad
1	Keine	Alkohol	4,9	37,3	13	3,5	11,2	31
2	Keine	Holzgeist	3,7	38,8	10	2,4	8,8	27
3	Petroläther	Alkohol	5,3	35,0	15	3,6	9,8	37
4	Petroläther	Holzgeist	3,7	41,2	9	2,3	8,2	28
5	Benzol	Alkohol	6,1	43,7	14	3,9	8,0	49

c) Die Grundlagen der neuen Extraktionsmethode[1]).

Eine unerwartete Verbesserung von großer Bedeutung gegenüber den beschriebenen Extraktionsverfahren ist die Anwendung von Lösungsmitteln mit erheblichem Wassergehalt.

Durch die mit wasserhaltigen Solvenzien entstehende Salzlösung (z. B. KNO_3) wird der Zustand des in den Chloroplasten kolloidal gelösten Chlorophylls verändert, es wird leicht löslich.

Außerdem wird die Menge der in Lösung gehenden Begleitstoffe vermehrt; nicht mehr das Lösungsmittel selbst, sondern seine Mischung mit den Begleitstoffen wird das eigentliche Extraktionsmittel für das Blattgrün, und zwar ein so ausgezeichnetes, daß damit die Farbstoffe rasch und leicht fast quantitativ

[1]) Unveröffentlicht.

ausgezogen werden. Es scheint, wie wenn geradezu die ganze Chloroplastensubstanz vom Lösungsmittel mit geeignetem Wassergehalt weggeführt würde.

Die Begleitstoffe der Pigmente sind zu unterscheiden als solche, die in Petroläther leicht löslich und in wasserhaltigen Solvenzien schwer löslich sind und andere von reziproker Löslichkeit. Wasserfreie Lösungsmittel extrahieren viele Begleitstoffe des Chlorophylls, die diesem in den Löslichkeitsverhältnissen gleichen und ihm daher hartnäckig folgen. Die wasserhaltigen Extrakte hingegen sind arm an Begleitstoffen, die mit dem Chlorophyll beim Entmischen in den Petroläther übergehen, und an denjenigen, die sich beim Ausfällen des Chlorophylls mit Wasser oder bei der Abscheidung des Phäophytins niederschlagen.

Quantitative Bestimmungen. Um die Wirkung der wichtigsten Lösungsmittel, wasserfrei und mit wechselndem Wassergehalt, quantitativ zu vergleichen und die besten Bedingungen für die Extraktion zu finden, haben wir die Arbeitsweise des präparativen Maßstabes eingehalten: die Mengen der Pflanzenmehle und Lösungsmittel und die Zeit der Extraktion.

Mit jedem Extraktionsmittel, auch dem wasserfreien, wäre es bei genügend langer Versuchsdauer und unbeschränktem Verbrauch an Lösungsmitteln möglich, allen Farbstoff zu extrahieren. Für den Vergleich wird die Menge der Lösungsmittel ziemlich gleichmäßig so gewählt, daß sie im günstigsten Falle zur vollständigen Extraktion hinreicht und die Zeit, wie sie eben hierfür erforderlich ist. Daher muß für die gleichmäßige Durchführung der Versuche die Filtration bei einigen wasserfreien Lösungsmitteln verzögert werden, weil diese an sich zu rasch durchlaufen. Um gleiche Volumina der Extrakte zu bekommen, ist noch zu berücksichtigen, daß die Lösungsmittel ungleich vom Pflanzenmehl zurückgehalten werden, die wasserhaltigen reichlicher.

Die Unterschiede im Chlorophyllgehalt würden vergrößert, wenn wir von den Extrakten nur die erste Hälfte vergleichen würden; bei wasserhaltigem Aceton enthält sie schon den größeren Teil des Farbstoffes, während bei den wasserfreien Lösungsmitteln die Extraktion gleichmäßig vom Anfang bis zum Ende verläuft.

Aber für die Anlehnung an die präparative Methode ist der Vergleich der ganzen Extraktion wichtiger.

Für den folgenden Vergleich der Extrakte mit Aceton, Alkohol, Holzgeist und Äther ist ein von uns selbst Anfang Mai gesammeltes Quantum Brennesseln verwendet worden, das nach dem Trocknen und Mahlen (15,5 kg) noch einige Tage bei 30—40° zur vollständigen Trocknung ausgebreitet worden ist. Dabei wurden 900 g Feuchtigkeit abgegeben; das Material der Versuche enthielt dann nur noch 1,3% Feuchtigkeit, es färbte daher Benzol nicht an.

1/2 kg von diesem Brennesselmehl wurde unter Saugen mit zwei Wasserstrahlpumpen auf eine Nutsche (von 24 cm innerem Durchmesser) über Koliertuch aufgeschichtet und etwas fest gestopft. Wir gossen nun, ohne zu saugen, 1/2 l Lösungsmittel auf und ließen es 5 Minuten lang in das Mehl einsickern. Dann wurde 1/4 l davon nachgefüllt und bei allen Versuchen ungefähr gleich mit einer Wasserstrahlpumpe gesaugt, nachdem, um ein starkes Verdunsten des Extraktionsmittels während des Absaugens zu verhüten, 50 ccm des betreffenden wasserfreien Lösungsmittels in den Absaugekolben gegeben worden waren. Man saugt nur so schwach, daß das Lösungsmittel im Kolben nicht zu lebhaftem Sieden kommt. Nach 5 Minuten füllten wir wieder 1/4 l auf und saugten weitere 10 Minuten ab. Auch zwei folgende Viertelliter ließen wir in je 10 Minuten durchfließen und zum Schlusse saugten wir mit beiden Wasserstrahlpumpen kräftig ab. Wegen des Aufquellens der Blattsubstanz mit wasserhaltigen Solvenzien ist so viel Zeit erforderlich.

Wir arbeiten mit 1 1/2 l Lösungsmittel immer auf 0,8—0,9 l Extrakt hin. Mit den wasserfreien Lösungsmitteln bekommt man leicht so viel und bricht dann den Versuch ab; ein etwas kleineres Volumen bei den stark wasserhaltigen Lösungsmitteln macht keinen Fehler aus, weil hier der letzte Teil des Extraktes sehr arm an Chlorophyll wird.

Wenn sich bisweilen im Saugkolben etwas Rohchlorophyll ausschied, so wurde es mit Aceton aufgenommen und mit den Extrakten vereinigt. In den meisten Fällen brachten wir das Volumen derselben auf 1 l und bestimmten das Chlorophyll colorimetrisch

durch Verseifen mit Alkali und Vergleich mit krystallisiertem Chlorophyll nach der Methode von Kap. IV, Abschn. 1.

Die Ergebnisse des Vergleichs, welche von den Versuchsbedingungen und dem Pflanzenmaterial wenig beeinflußt werden, enthält die folgende Tabelle, und die graphische Darstellung der Fig. 3 gibt dafür ein anschauliches Bild. Die Zahl der Bestimmungen reicht zwar nicht aus, um die Kurven in ihren Einzelheiten genau zu bestimmen, aber ihr Verlauf ist durch eine wiederholte Versuchsreihe bestätigt worden.

Tabelle.

Die angewandten Brennesseln enthalten in 1 kg des trockenen Mehles 10 g Chlorophyll.

Volumprozentigkeit	Chlorophyllgehalt der Extrakte in g			
	Aceton	Äthylalkohol	Methylalkohol	Äther
100	3,05	5,4	6,2	1,6
97	7,70	—	—	—
95	—	6,6	2,9	—
90	9,45	8,5	—	—
85	9,75	7,5	0,4	—
80	9,15	6,8	—	—
75	7,80	4,2	—	—
70	7,10	—	—	—
65	5,60	—	—	—

Während die wasserfreien Extraktionsmittel sich in die Reihenfolge ordnen: Äther, Aceton, Äthylalkohol, Methylalkohol, stellt schon ein Wasserzusatz von nur 1% Aceton, Äthyl- und Methylalkohol in ihrer Extraktionswirkung gleich (Chlorophyllgehalt $5^1/_4$ g). Ein größerer Wassergehalt kehrt die Reihenfolge um, Äthylalkohol wird übertroffen von Aceton.

Auf diesen Ergebnissen beruhen unsere Methoden für die Isolierung des Chlorophylls und der begleitenden Pigmente und für die Gewinnung von Phäophytin.

Die Extraktion mit Aceton erfordert einen Wassergehalt von 10—20% Wasser. Das Optimum liegt bei 15 Volumprozent Wasser. Dennoch wenden wir für die Extraktion 80prozentiges Aceton an und erzielen dann mit etwas mehr Lösungsmittel eine ebenso

günstige Chlorophyllausbeute. Mit dem wasserreicheren Aceton sinkt die Menge der petrolätherlöslichen Begleitstoffe, die Isolierung des Chlorophylls wird erleichtert.

Für Alkohol finden wir das Optimum bei einem Wassergehalt von 10 Volumprozent. Dies gilt auch für käufliches Brennesselmehl, das für die Gewinnung von Phäophytin wichtig ist und für diesen Zweck mit 90prozentigem Alkohol ausgezogen wird.

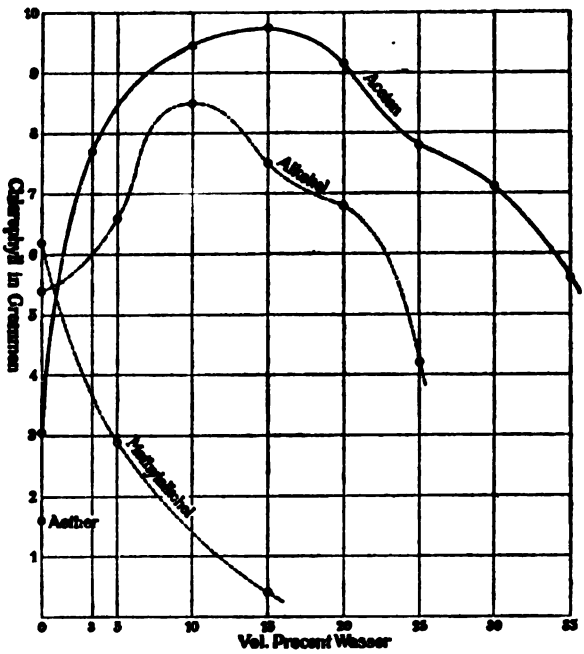


Fig. 3.

Vergleichsweise extrahierten wir je 1 kg von käuflichem Brennesselmehl, das nur 5,1 g Chlorophyll enthielt, ohne es nachzutrocknen, auf der Nutsche mit 1½ l Alkohol von wechselndem Wassergehalt; bei dem feineren, spezifisch schweren, aber farbstoffarmen Material genügt dieses Volumen. Der Chlorophyllgehalt der Extrakte (0,9 l) betrug bei

95 prozentigem	Alkohol	. . .	4,28 g
90 „	„	. . .	5,04 g
85 „	„	. . .	4,67 g.

d) Extraktionsmethode mit wasserhaltigen Lösungsmitteln[1]).

Verfahren für getrocknete Blätter. Die Extraktion nach der neuen Methode geschieht mittels der Nutsche unter Anlehnung an das oben beschriebene Nutschenverfahren.

[1]) Unveröffentlicht.

Die Hauptbedingungen für die Ausführung der Methode ist die Anwendung niedriger Schichten von Blattmehl, damit die Extrakte nicht zu konzentriert und sirupös werden. Sie bilden sonst in den tieferen Schichten des Pulvers Ausscheidungen von Chlorophyll und anderen Stoffen, welche die Filtration verzögern und gänzlich zum Stillstand bringen können. Auch bringt eine höhere Schicht den Nachteil mit sich, daß die gebildeten starken Extrakte mehr und mehr von den Fetten und Wachsen mitnehmen, die den Reinheitsgrad der Chlorophyllösung herabdrücken. Wir verwenden daher, gleichgültig ob die Blattmehle chlorophyllreich oder -arm, fein oder gröber und daher spezifisch leichter sind, nie höhere Schichten als 4—5 cm in festgesaugtem Zustand, und zwar auf sehr breiten wie auf kleinen Nutschen.

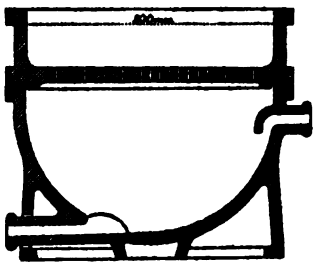


Fig. 4.

Da die Steinzeugnutschen der Technik für ein solches Verfahren ungeeignet sind, haben wir von den Ton- und Steinzeugwerken, A.-G., Charlottenburg, nach nebenstehender Zeichnung (Fig. 4) Nutschen von 50 cm lichtem Durchmesser herstellen lassen, die mit 2—4 kg Blattmehl beschickt werden können.

Das Verfahren wird in der Handhabung etwas verschieden, je nach dem Chlorophyllgehalt und der Feinheit der Blattmehle. Da die Extraktion scharf schichtenweise nach unten vorrückt und jede Schicht sogleich erschöpft wird, so untersuchen wir durch eine Stichprobe mit dem Spatel, wie tief das Auslaugen gegangen und das Material entfärbt, d. h. gelblich oder grau geworden ist.

Die chlorophyllreichen, selbstgesammelten Brennesseln erfordern viel mehr Lösungsmittel als die käuflichen Mehle; von diesen lassen sich größere Chargen bewältigen.

Bei kleinen Mengen wird ähnlich gearbeitet wie bei den oben angeführten quantitativen Versuchen; z. B. $^1/_2$ kg von gutem Material mit 1,5—1,6 l Lösungsmittel war in $^1/_2$ Stunde ausgezogen, wodurch 0,9 l Extrakt mit $4^1/_4$—$4^1/_2$ g Chlorophyll erhalten werden. Mit dem Mehl chlorophyllreicher Blätter arbeiten wir in

keiner größeren Charge als 2 kg auf der Steinzeugnutsche. Diese Füllung, die mit dem Maschinenvakuum gut festgesaugt wird, extrahieren wir unter abwechselndem Einsickern und Absaugen mit 6 l 78—80prozentigem Aceton, die in mehreren Portionen aufgegossen werden. Die Versuchsdauer ist $^1/_2$—$^3/_4$ Stunde. Die Menge des Extrakts beträgt 4 l mit einer Chlorophyllausbeute von 16 bis 17 g. Das Mehl wird strohgelb, nur wenige Stellen der unteren Schicht sind noch grünlich.

Von technischem Brennesselmehl gehen 4 kg auf eine Charge. Sie erfordern z. B. 6—8 l von 90prozentigem Alkohol, die in 20—30 Minuten, also rascher wie wasserhaltiges Aceton, filtrieren, und $3^1/_2$—$5^1/_2$ l Extrakt mit einem Chlorophyllgehalt von 19 bis 24 g geben. 12 solche Chargen kann ein Arbeiter im Laboratorium mit 2 Nutschen täglich herstellen (vgl. die Anwendung für Phäophytin im 3. Abschnitt des XIII. Kapitels).

Das Chlorophyll ist in der Acetonlösung vor Allomerisation geschützt; die beschriebenen Extrakte liefern daher Präparate, deren Spaltungsprodukte besonders rein sind. Aber auch im alkoholischen Extrakt ist infolge der raschen Herstellung und infolge des Wassergehalts das Chlorophyll wenig gefährdet.

Verarbeitung frischer Blätter. Auch frische Blätter werden am besten mit 80prozentigem Aceton extrahiert. Für die Verarbeitung verschiedener Pflanzen in ungetrocknetem Zustand ist oben (Abschn. 1) auf eine Vorbehandlung mit wasserhaltigem Alkohol hingewiesen worden, wodurch die Zerkleinerung erleichtert wird. Das übliche Pflanzenmaterial, nämlich Brennesseln, kann man aber einfacher und rascher ohne weiteres durch eine geeignete Syenitwalzenmühle mit Motorantrieb zerkleinern und dann einer Vorextraktion mit wenig Aceton unterwerfen, um das Material zu entwässern, Pflanzenschleime zu entfernen und Enzymwirkungen zu hemmen. Infolge des größeren Volumens ist der Verbrauch an Lösungsmitteln bedeutend und die Extrakte werden verdünnt; ihr Reinheitsgrad ist aber dank der Vorbehandlung weit höher, z. B. 21, während er in entsprechenden Extrakten guter trockener Blätter 8—10 zu sein pflegt.

$2^1/_2$ kg frische Brennesseln werden dreimal bei allmählich enger

gestellten Walzen gemahlen, was $^1/_2$ Stunde erfordert. Dabei entsteht ein klebriger, tief olivbrauner Brei, ohne daß indessen das Chlorophyll geschädigt wird. Da man die Blattsubstanz in diesem Zustand nur schwierig und mit Verlust von Farbstoff abpressen kann, schütteln wir sie zuerst mit $1^1/_2$ l Aceton in einer Pulverflasche kurz an und saugen auf der Nutsche ab; die gelbe bis bräunliche Flüssigkeit enthält kein Chlorophyll, sie färbt Äther nicht an. Den Rückstand pressen wir in Koliertuch eingepackt mit einer Buchnerschen Presse bei ungefähr 200 Atmosphären Druck; der Preßkuchen wiegt beispielsweise 0,8 kg, wovon 0,5 kg Trockensubstanz zu rechnen sind. Der Kuchen wird zerbröckelt und passiert wieder zweimal die Syenitwalzenmühle. Dann schütteln wir das Pulver 5 Minuten lang in einer Flasche mit $1^1/_2$ l Aceton an, das sich mit der zurückgehaltenen Feuchtigkeit der Blattsubstanz auf 80 Volumprozent verdünnt und setzen noch einen weiteren Liter 80prozentiges Aceton hinzu. Die lösende Wirkung der Beimischungen läßt sich hier nicht in demselben Maße ausnützen wie beim trockenen Mehl und die Extraktion kann nicht einfach auf der Nutsche vorgenommen werden, das Lösungsmittel würde zu rasch aus der voluminösen Masse abfließen. Wir saugen schließlich den dünnen Brei wieder auf der Nutsche scharf ab und waschen ihn dreimal nach mit je $^1/_2$ l 80prozentigem Aceton unter abwechselndem Macerieren und Saugen. Das Mehl bleibt nahezu frei von grünem Pigment zurück. Der Extrakt, dessen Gewinnung im ganzen $1^1/_2$ Stunden dauert, enthält 4,7 g Chlorophyll in 3,7 l; infolge seines Wassergehaltes ist er arm an den störenden Begleitstoffen.

Die Methode hat sich besonders bewährt bei der Verarbeitung von Braunalgen (Fucus). Nach dem ersten Zerkleinern wird durch die Vorextraktion mit Aceton eine sehr große Menge lästiger Schleimsubstanzen entfernt, welche die Extraktion und später die Entmischungen stören und die Isolierung der Farbstoffe sehr erschweren würden.

IV. Quantitative Analyse der vier Chloroplastenfarbstoffe.

Unsere quantitative Analyse der beiden grünen und der zwei gelben Pigmente der Chlorophyllkörner beruht auf ihrem colorimetrischen Vergleich mit Lösungen von bekanntem Gehalt und findet Anwendung zur Bestimmung der Mengen und des Verhältnisses dieser Farbstoffe im Blatte, in Extrakten oder in Präparaten.

Die Bestimmung des Verhältnisses der Komponenten a und b des Chlorophylls haben Willstätter und Isler in einer den Grund legenden Untersuchung behandelt, deren Methodik wir weiter entwickeln. Dazu kommt die Behandlung der neuen Aufgabe, das Mengenverhältnis der zwei gelben Pigmente zu einander und zu den grünen zu bestimmen.

Wir lassen die Methoden vorangehen, die der quantitativen Bestimmung des Chlorophyllgemisches dienen und diejenigen folgen, welche das Komponentenverhältnis der grünen und der gelben Farbstoffe betreffen.

1. Bestimmung des Chlorophylls (a + b)[1]).

Die Rohchlorophyllösung enthält die vier Pigmente von verschiedener Farbe und Farbintensität in Mengenverhältnissen, die vom Lösungsmittel beeinflußt werden und die von der Pflanzenart und sogar von der Ernte einer und derselben Pflanze abhängig sein können. Annähernd gleich ist das Mengenverhältnis der Komponenten bei den Extrakten einer Pflanze; man kann daher durch

---

[1]) Ältere Angaben darüber siehe Ann. d. Chem. 371, 11 [1909] und 380, 177 [1911].

den Vergleich derselben die relative Bestimmung ihres Chlorophyllgehaltes ausführen. Für die Untersuchung von Extrakten ungleicher Farbnuance, also z. B. aus verschiedenen Pflanzen, ist es erforderlich, die Farbstoffe durch Verseifung mit Alkali in die indifferenten gelben und in die Alkalisalze der grünen Pigmente zu trennen. Die erhaltenen Chlorophyllinlösungen ermöglichen die relative Bestimmung des Farbwertes und ferner erlaubt ihr Vergleich mit einer alkoholischen Lösung von bekanntem Chlorophyllgehalt die absolute Bestimmung des Farbstoffgehalts.

Auch das Verhältnis der blaugrünen zur gelbgrünen Komponente des Chlorophylls ist wechselnd in Extrakten oder Präparaten. Deshalb wählen oder mischen wir das Vergleichspräparat von Chlorophyll oder Phäophorbid im Komponentenverhältnis ähnlich der zu untersuchenden Probe.

a) Relative Bestimmung.

Um zu ermitteln, wieviel Prozent des aus einem Pflanzenmaterial extrahierbaren Chlorophylls in eine Lösung übergegangen ist, vergleicht man diese mit dem quantitativen Auszug einer gewogenen kleinen Menge des nämlichen Materials. Dabei gibt es beim colorimetrischen Vergleich keine oder nur unerhebliche Nuancendifferenzen.

Neben der Verarbeitung eines Blättermehles in großem Maßstabe beschicken wir z. B. einen kleinen Perkolator mit 100 oder 200 g desselben Pulvers und perkolieren mit Alkohol erschöpfend, also bis der Ablauf farblos ist, oder wir extrahieren 10—50 g Blattmehl auf einer kleinen Nutsche mit 85 prozentigem Aceton quantitativ, was auch bei nicht sehr feinem Mehl in 1 Stunde erreicht wird. Für den colorimetrischen Vergleich verdünnt man die Extrakte am zweckmäßigsten mit dem Lösungsmittel so, daß 1 kg Blattpulver 200 l Extrakt gibt.

Das Perkolat aus 36 kg Brennesseln (angesetzt mit dem Nachlauf einer vorangehenden Charge) enthielt 79,3% der Nachlauf dieses Perkolates 10,9% des Gesamtchlorophylls. Das Perkolat einer Charge von nur 3 kg Brennesseln enthielt 78,8% der möglichen Ausbeute.

Auf dieselbe Weise mit Hilfe quantitativer Auszüge gewogener Blattmengen lassen sich auch verschiedene Lieferungen oder Ernten derselben Pflanze, ferner frische und getrocknete Blätter der nämlichen Pflanze und auch die Blätter verschiedener Pflanzen vergleichen.

Je 10 g Mehl von getrockneten selbstgesammelten und von technischen Brennesseln wurden auf einer kleinen Nutsche im Laufe einer Stunde mit 200 ccm 85 prozentigem Aceton erschöpfend extrahiert. Man verdünnte den Extrakt auf 200 ccm mit demselben Lösungsmittel und von dieser Lösung 10 ccm mit 95 prozentigem Alkohol auf 100 ccm. Beim colorimetrischen Vergleich dieser Lösungen ergab sich, daß das Mehl aus selbst gesammelten Blättern 1,71 mal so viel Chlorophyll enthielt, wie technisches Brennesselmehl. Die Chlorophyllmengen in den quantitativen Extrakten wurden auch durch Vergleich mit einer Lösung von bekanntem Chlorophyllgehalt absolut bestimmt. Die gefundenen Werte ließen das Verhältnis von Chlorophyll aus selbstgesammeltem zum Chlorophyll aus technischem Material wie 1,70 : 1 berechnen.

Die relative Wertbestimmung genügt auch für eine absolute Bestimmung des Chlorophyllgehaltes von Lösungen, nachdem man den Chlorophyllgehalt eines Blattmehles einmal absolut bestimmt hat.

b) Absolute Bestimmung.

Die quantitative Bestimmung wird durch den Vergleich mit reinem Chlorophyll ausgeführt. Früher stand dafür nur sogenanntes krystallisiertes Chlorophyll (Äthylchlorophyllgemisch) zur Verfügung. Der Vergleich mit diesem ermöglichte es, die Steigerung des Reinheitsgrades bei der Isolierung von natürlichem Phytylchlorophyllidgemisch zu kontrollieren und schließlich das reine Präparat herzustellen. Heute sind die beiden Chlorophyllgemische in reinem Zustande gleich leicht zugänglich und wir verwenden beide zum Bereiten der colorimetrischen Vergleichslösungen.

Eine geeignete Konzentration der Chlorophyllnormallösung erhält man mit 0,0500 g Phytylchlorophyllid oder 0,0362 g Äthyl-

chlorophyllid[1]) in 2 l Alkohol. Man löst daher 0,0500 g Chlorophyll mit einem Zuschlag von 2,5% für Trockenverlust, also praktisch 0,0513 g oder 0,0362 g mit Zuschlag von 5% Trockenverlust (100°, Hochvakuum), also 0,0380 g Äthylchlorophyll in 100 ccm absolutem Alkohol und kann diese Lösung im Dunkeln aufbewahren. Zum colorimetrischen Vergleich verdünnt man davon 10 ccm auf 200 ccm. Die Versuchslösung wird annähernd auf dieselbe Konzentration gebracht.

Die Übereinstimmung in den Farbnuancen bewirkt man durch die Auswahl eines Vergleichspräparates mit ähnlichem Komponentenverhältnis, wie im Versuchsobjekt oder man mischt die isolierten Komponenten a und b in solchem Verhältnis.

Die Wertbestimmung einer Rohlösung oder eines Rohproduktes erfordert die quantitative Trennung der grünen von den gelben Pigmenten, die Intensität und Farbnuance beeinflussen würden. Eine kleine gemessene Probe (10 ccm) z. B. eines Aceton- oder Alkoholextraktes wird mit Äther auf 100 ccm verdünnt; von der Mischung gibt man 10 ccm in einen Scheidetrichter und verdünnt weiter mit Äther etwa aufs Fünffache. Im Falle eines alkoholischen Extraktes kann man die verdünnte Ätherlösung ohne weiteres mit 4—5 ccm methylalkoholischem Kali tüchtig durchschütteln, wobei die braune Phase eintritt; enthält aber die Lösung Aceton, so muß dieses unter Zusatz von etwas Methylalkohol vor der Verseifung mit Wasser vollständig aus dem Äther herausgewaschen werden, weil Chlorophyllinalkali von Aceton verdorben wird. Nach dem Wiederkehren der reingrünen Farbe gießt man unter Umschütteln langsam Wasser in den Scheidetrichter und führt das anfangs von der methylalkoholischen Lauge aufgenommene Xanthophyll wieder in Äther über. Man läßt die wässerig alkalische Chlorophyllinlösung in einen 200 ccm-Meßkolben fließen, schüttelt die ätherische Lösung der gelben Pigmente noch etwas mit Wasser aus und verdünnt die rein grüne Lösung mit Alkohol auf 200 ccm. Das Chlorophyllin vergleichen wir nun mit der oben beschriebenen Lösung von bekanntem Gehalt im Colorimeter nach Duboscq, wobei unter

[1]) Der Berechnung sind die Molekulargewichte der Komponente a zugrunde gelegt.

Vertauschen der Gefäße mehrere Ablesungen gemacht und die Mittelwerte bestimmt werden.

Der Vergleich des verseiften Chlorophylls mit dem unverseiften der Vergleichslösung bringt keinen Fehler mit sich: 10 ccm einer ätherischen Lösung von reinem Chlorophyll (0,0500 g in 100 ccm) wurden auf 200 ccm mit Alkohol verdünnt, weitere 10 ccm mit 3 ccm methylalkoholischem Kali verseift, mit etwas Wasser aufgenommen und gleichfalls mit Alkohol auf 200 ccm gebracht. Die beiden Lösungen stimmten dann in der Intensität gut überein, nur war die Nuance des Chlorophyllinkaliums etwas blauer.

Beispiele. 2 kg Mehl mit 7% Feuchtigkeitsgehalt aus selbstgesammelten Brennesseln gaben auf einer Nutsche von 50 cm Durchmesser mit 6 l 90prozentigem Alkohol rasch ausgezogen 4,35 l Extrakt. Eine 10 ccm-Probe desselben ist mit Äther auf 100 ccm verdünnt und aus einem Zehntel davon sind 200 ccm Chlorophyllinlösung erhalten und mit der Vergleichslösung bestimmt worden. Die Mittelwerte der Colorimeterablesungen betrugen 50 mm für die Versuchs-, 35,5 mm für die Vergleichslösung. Demnach enthielt der Extrakt $\frac{4{,}35 \cdot 35{,}5 \cdot 5}{50} = 15{,}5$ g Chlorophyll d. i. 7,75 g pro Kilogramm Mehl.

Ein quantitativer Nutschenextrakt (200 ccm) aus 10,0 g desselben Mehles mit 85prozentigem Aceton gab aus einer 10 ccm-Probe ohne Teilung 200 ccm Chlorophyllinlösung. Die Colorimeterschicht der Vergleichslösung betrug diesmal 43 mm. Der Chlorophyllgehalt der angewandten 10 g beträgt daher 0,086 g, d. i. 8,6 g im kg Blattmehl. Daraus ergibt sich für den in größerem Maßstab gewonnenen Extrakt eine Chlorophyllausbeute von 90%.

Von frischen Blättern wird für die Bestimmung des Chlorophyllgehalts eine gewogene Menge mit Quarzsand zerrieben und dann auf der Nutsche mit ca. 90prozentigem Aceton erschöpfend extrahiert. Man führt eine Probe in Äther über, wäscht das Aceton tunlichst heraus und trennt die gelben Begleiter durch Verseifen des Chlorophylls von den grünen ab.

Der Reinheitsgrad von Chlorophyllpräparaten, die frei oder annähernd frei von gelben Pigmenten sind, ebenso von Darstellungen

der Chlorophyllinsalze wird durch Vergleich einer gewogenen Substanzmenge in Alkohol mit unserer Lösung von bekanntem Gehalt bestimmt. Für Rohchlorophyllpräparate, die viel gelbe Pigmente als Verunreinigungen enthalten, wenden wir die Verseifungsmethode an.

Rohchlorophyll erhielten wir aus gutem Brennesselmaterial in einer Ausbeute von 6,5—7 g pro Kilogramm Mehl. In diesem Falle fanden wir das Verhältnis der Colorimeterschichten wie 50 : 45 bis 47,5. Die Präparate waren also 90—95 prozentig.

Präparate aus technischem Brennesselmehl erforderten als Farbäquivalent 42—40 mm Vergleichslösung; sie waren mit 16—20% farblosen Begleitern verunreinigt.

Die quantitative Chlorophyllbestimmung hat die ersten Versuche der Isolierung von Chlorophyll geleitet und findet auch heute bei der Gewinnung von Chlorophyllpräparaten häufige Anwendung, um den Reinheitsgrad von Lösungen zu ermitteln. Wir bestimmen nach jeder Reinigungsoperation den Trockenrückstand durch Eindampfen einer Probe im Vakuum bei 100° und den absoluten Chlorophyllgehalt der Lösung.

Ein Rohextrakt mit 85 prozentigem Aceton zur Darstellung von Reinchlorophyll enthielt 16,8 g Chlorophyll und 135,2 g bei 100° im Vakuum nicht flüchtigen Rückstand; er war also 12 prozentig in bezug auf Chlorophyll. Nach den folgenden Reinigungsoperationen steigerte sich der Reinheitsgrad auf ca. 45, dann auf 65%.

Bei den zwei Komponenten des Phäophytins ist der Farbunterschied noch größer als beim Chlorophyll; a ist olivgrün, b rotbraun. Es ist daher beim Phäophytin noch wichtiger, die Vergleichslösung durch Mischen der einheitlichen Methylphäophorbide oder Phäophytinkomponenten dem zu untersuchenden Phäophytinpräparat anzupassen, dessen Komponentenverhältnis mit einer Spaltungsprobe geschätzt wird.

Die gewöhnliche Vergleichslösung enthält 0,0500 g Phäophytin vom Komponentenverhältnis 2,5 oder 0,0350 g Methylphäophorbid, nämlich 0,0250 g a + 0,0100 g b in 25 ccm Chloroform gelöst und mit Äther auf 200 ccm, davon 10 ccm nochmals aufs Zehnfache verdünnt.

2. Das Verhältnis der Komponenten a und b des Chlorophylls.

a) Zur Geschichte der Methode.[1])

Da es gelingt, das Chlorophyll aus beliebigen Pflanzen ohne Bildung von Nebenprodukten in Phytochlorin e und Phytorhodin g überzuführen, so ermitteln wir das Verhältnis der Komponenten durch die quantitative Bestimmung der Ausbeuten an diesen beiden Verbindungen beim Abbau. Sie kann am einfachsten und mit den kleinsten Mengen erfolgen durch colorimetrischen Vergleich der bei der Spaltung erhaltenen Lösungen mit den bekannten reinen Substanzen.

Wenn es sich um das Komponentenverhältnis in isolierten Präparaten, im Chlorophyll oder Phäophytin handelt, so hängt die Bestimmung hauptsächlich ab von der quantitativen Ausführung der Hydrolyse in der einzigen Richtung zu den zwei normalen Spaltungsprodukten und von der quantitativen Trennung beider. Um die Methode auf die Untersuchung des Pigmentes der grünen Blätter zu übertragen, kommt als eine weitere Bedingung hinzu, daß die bei der Extraktion möglichen Fehler vermieden werden.

Bei den ersten Beobachtungen über das Komponentenverhältnis haben Willstätter und Isler viele Phäophytinpräparate übereinstimmend gefunden, einzelne aber stark abweichend, besonders das Phäophytin aus Pinus und Melisse viel reicher an der Komponente b. Eben durch diese scheinbaren Ausnahmen sind hauptsächliche Fehler der Methode aufgedeckt worden, nämlich:

1. Schon bei der Extraktion des Chlorophylls aus den Blättern kann eine Fraktionierung des Gemisches der beiden Komponenten stattfinden.

Es ist daher erforderlich, wenn die Bestimmung für den Farbstoff im Blatte gelten soll, denselben quantitativ auszuziehen.

2. Je nach der Verdünnung der Extrakte, ihrem Wassergehalt und nach der Menge von Begleitstoffen scheidet sich das Phäophytin mehr oder weniger unvollständig aus. Es hat sich gezeigt,

---

[1]) Ann. d. Chem. 380, 159 [1911] und Ann. d. Chem. 390, 290 [1912].

daß der abgeschiedene und der gelöste Anteil im Komponentenverhältnis differieren. Das Gelöste ist nämlich reicher an der Komponente a.

Es ist daher nötig, wenn die Bestimmung für den Farbstoff im Extrakte gelten soll, denselben quantitativ als Phäophytin zur Verseifung zu bringen.

3. Auch bei der Umscheidung des Phäophytins, z. B. aus Chloroform mit Alkohol erfolgt eine Verschiebung im Komponentenverhältnis im nämlichen Sinne wie bei der Ausscheidung. Wir verzichten daher auf die Wägung des Phäophytins, also auf seine Reinigung.

Das Komponentenverhältnis des isolierten Phäophytins ist von Interesse für die Beurteilung gegebener Präparate, aber es drückt nicht das Komponentenverhältnis des Chlorophylls aus.

Nur wenn die Ausbeute irgend eines Phäophytins einen hohen Bruchteil der Theorie beträgt, muß sich sein Komponentenverhältnis demjenigen des Chlorophylls nähern. Daher sind die bei unseren in größerem Maßstab dargestellten Phäophytinpräparaten gefundenen Werte annähernd brauchbar.

Zur Bestimmung des Komponentenverhältnisses für das Chlorophyll der verschiedenen Pflanzen gründen Willstätter und Isler daher ihre Methode auf die vollständige Extraktion des Farbstoffs, seine verlustlose Überführung in Rohphäophytin, dessen möglichst glatte Verseifung und die quantitative Isolierung von Chlorin und Rhodin.

Mittels dieser Methode haben Willstätter und Isler einen Anfang gemacht, das Verhältnis der Chlorophyllkomponenten für eine Anzahl von Pflanzen zu bestimmen und es allgemein annähernd konstant gefunden, nämlich im Mittel von 24 Versuchen = 2,5(7). Die größten Abweichungen betrugen $\pm 0{,}4$—0,5. Es blieb noch unentschieden, ob diese innerhalb der Fehlergrenzen der Methode lagen oder nicht. Wir finden heute, daß diese Abweichungen nicht etwa nur auf Fehlern der Bestimmung beruhen, obwohl die Genauigkeit derselben noch zu übertreffen war.

In dem Verfahren liegt auch eine neue quantitative Bestimmung des Chlorophylls der Extrakte und der Pflanzen.

Willstätter und Isler finden so den Chlorophyllgehalt der Blätter zumeist = 0,7—1% des Trockengewichtes.

Die Ergebnisse hinsichtlich der Zusammensetzung des Chlorophylls aus seinen beiden Komponenten entfernen sich weit von den früheren Annahmen.

H. C. Sorby[1]) hat das Verhältnis spektrophotometrisch unter der allerdings unrichtigen Voraussetzung gleicher Absorptionswirkung der beiden Komponenten im Rot geschätzt, indem er die Chlorophyllösung in einer Röhre so weit verdünnte, bis das erste Absorptionsband der Komponente a in derselben Intensität erschien wie das erste Band der Komponente b in einer zweiten Röhre. Seine Bestimmungen ergaben bei gesunden grünen Blättern auf 1 Teil Chlorophyll b 5,9—7,7 Teile Chlorophyll a.

Über die Veränderlichkeit des Verhältnisses urteilt Sorby:

„The normal relative amount of yellow chlorophyll in green leaves certainly varies, and there seems reason to believe that this to some extent, if not mainly, depends on the length of time to which they have been exposed to the sun."

Zu ähnlichen Werten ist Tswett[2]) durch eine spektroskopische Schätzung gelangt und namentlich bei seiner chromatographischen Adsorptionsanalyse durch den Vergleich der Höhen der in ihrer Farbe etwa gleich gesättigt erscheinenden Chlorophyllzonen a und b. Seine Bestimmungen ergeben das Verhältnis a : b = 4 bis 6 : 1.

Vor kurzem haben auch C. A. Jacobson und L. Marchlewski[3]) eine Untersuchung: „Über die Dualität des Chlorophylls und das wechselnde Verhältnis seiner Komponenten" veröffentlicht. Sie finden, daß die klimatischen Bedingungen eine wichtige Rolle in der Produktion der einen oder anderen Komponente des Chlorophylls zu spielen scheinen und sie teilen noch mehrere Belege mit für den Satz, daß das Verhältnis der Chlorophyllkomponenten mit der Pflanzenart und mit den Wachstumsbedingungen derselben Art variiere.

---

[1]) Proc. Roy. Soc. 21, 480 [1873].
[2]) Ber. d. d. bot. Ges. 25, 396 [1907].
[3]) Bioch. Zeitschr. 39, 174 [1912].

Die hauptsächlichen Fehler dieser Untersuchung bestehen darin, daß für die Bestimmung des Komponentenverhältnisses in einer Pflanze nur ein beliebiger Teil des Chlorophylls extrahiert, ein beliebiger, unbekannter Teil des extrahierten Farbstoffs als Phäophytin gefällt und ein beliebiger Teil des Rohphäophytins durch Umscheiden isoliert wurde.

Diese prinzipiellen Fehler der Methodik sind von Willstätter und Isler überwunden worden.

Auf der Grundlage ihrer Untersuchung haben wir weitergearbeitet und zwar keine wesentlichen Irrtümer oder Unrichtigkeiten gefunden, aber Ungenauigkeiten in der Verseifung des Phäophytins und in der Fraktionierung der beiden Spaltungsprodukte zu vermeiden gelernt, die einen erheblichen Einfluß auf den Wert des Komponentenverhältnisses und auf die Beurteilung der Konstanz desselben ausüben.

b) Die Fehlerquellen der Bestimmung.[1])

Unvollständige Extraktion.

Eine Bedingung für die Ermittlung des wahren Verhältnisses ist die möglichst quantitative Extraktion des Chlorophylls.

Bei teilweisem Herauslösen des Chlorophylls aus frischen oder getrockneten Blättern gehen die Komponenten nicht in ihrem natürlichen Verhältnis in den Extrakt über, sondern es erfolgt dabei eine Fraktionierung.

Beispiel. Wir extrahierten 40 g Brennesselmehl auf der Nutsche an der Pumpe mit Sprit, und zwar so gründlich, als es mit diesem Lösungsmittel möglich ist. Der Extrakt war daher so verdünnt (über 300 ccm), daß er beim Ansäuern nicht ohne weiteres Phäophytin abschied. Wir setzten allmählich ein wenig Wasser hinzu, bis eine Ausscheidung von Phäophytin erfolgte. Sie wurde abfiltriert und vom Filter mit Äther quantitativ heruntergelöst; nach dem Verdampfen bestimmten wir im Rückstand das Verhältnis a zu b. Die weingeistige Mutterlauge schüttelten wir

[1]) Ann. d. Chem. 390, 294 [1912]; zum Teil unveröffentlicht.

quantitativ mit Äther aus und ermittelten auch in dem so isolierten Anteil des Phäophytins den Quotienten.

Das auf der Nutsche ausgezogene Blattmehl enthält nach früheren Erfahrungen mindestens $^1/_5$ vom Chlorophyll, das nur schwierig herausgelöst wird.

Wir schüttelten das Mehl in der Flasche mit viel Sprit, filtrierten und wiederholten zur völligen Erschöpfung noch zweimal diese Operation. Die vereinigten Nachextrakte sind angesäuert und dann zur Bestimmung des Verhältnisses ausgeäthert worden.

	Phytochlorin e	Phytorhodin g	Komponentenverhältnis
Phäophytinausscheidung	0,0123	0,0121	1,04
Phäophytin der Mutterlauge, 1. Probe . .	0,0173	0,0034	5,22
Phäophytin der Mutterlauge, Rest	0,0215	0,0050	4,38
Phäophytin des Nachextraktes, 1. Probe .	0,0054	0,0039	1,41
Phäophytin des Nachextraktes, Rest . .	0,0081	0,0048	1,73
Gesamtes Phäophytin.	0,0646	0,0292	2,26

Der Nutschenextrakt mit einem Gehalt von 76% des Gesamtchlorophylls gab daher den Quotienten 2,55, die Nachextrakte lieferten den Wert 1,57. Der in den Blättern zurückbleibende Anteil des Chlorophylls ist also viel reicher an der Komponente b.

Zugleich geht schon aus diesem Versuche hervor, daß das aus angesäuertem Extrakte ausgeschiedene Phäophytin ein total anderes Komponentenverhältnis zeigt, als der in der Mutterlauge gelöste Anteil (hier fast $^2/_3$); dieser ist stets arm an Komponente b.

Unvollständige Abscheidung.

Hierin liegt zufolge einer großen Anzahl von Versuchen, die mit verschiedenem Material ausgeführt worden sind, der wichtigste Fehler bei der Prüfung von isoliertem Phäophytin anstatt gesamtem extrahierbarem Farbstoff.

Beispiel. 100 g käufliches Brennesselmehl ist auf der Nutsche erschöpfend mit Sprit extrahiert und der Extrakt, der verdünnt war, mit Oxalsäure versetzt worden. Das bei zweitägigem Stehen abgeschiedene Phäophytin wurde in aliquoten Proben durch Verseifung und Fraktionierung bestimmt. Andererseits hat man für

den Vergleich aus der alkoholischen Mutterlauge den Rest des Phäophytins (57—58% der Gesamtmenge) ausgeäthert.

	Phytochlorin e	Phytorhodin g	Komponenten-verhältnis
Ausgeschiedenes Phäophytin .	1. 0,0049	0,0054	0,93
	2. 0,0046	0,0050	0,94
Phäophytin der Mutterlauge .	1. 0,0095	0,0038	2,58
	2. 0,0082	0,0037	2,27

Im gleichen Sinn wie durch die Verdünnung wird der Quotient zu ungunsten der Komponente a verschoben durch die Anwendung von höherprozentigem Alkohol z. B. gab ein Perkolatorversuch mit 99 prozentigem Alkohol ein Phäophytinpräparat mit dem Verhältnis 1,38, während ein mit 95 prozentigem Sprit gewonnener Extrakt von gleicher Chlorophyllkonzentration Phäophytin mit einem Quotienten von über 2 lieferte.

Die Fraktionierung durch das Lösungsmittel hat die Zusammensetzung unseres in großem Maßstab und mit guter Ausbeute gewonnenen Phäophytins wenig beeinflussen können. Denn wenn der freiwillig ausfallende Anteil etwa $^4/_5$ beträgt, so wird der Quotient des Präparates, obwohl in der Mutterlauge eine an der Komponente a reiche Phäophytinfraktion hinterbleibt, nicht zu stark vom wahren Komponentenverhältnis des Chlorophyllextraktes abweichen.

Ganz anders bei der Isolierung von Phäophytin aus Blättern, die sehr viel Extraktstoffe enthalten und sich daher für die Phäophytingewinnung wenig eignen. Das Phäophytin scheidet sich freiwillig nur in geringer Ausbeute aus den angesäuerten Extrakten gewisser Pflanzen ab, da die farblosen Begleiter es gelöst halten. Diese lösende Wirkung ist selektiv für die Komponenten, wohl viel mehr als die von Alkohol allein.

Man kommt daher bei der freiwilligen und unvollständigen Abscheidung des Phäophytins in gewissen Fällen, z. B. bei Pinus und Melisse zu Präparaten, deren Spaltung anormal hohe Ausbeuten an Phytorhodin ergibt. Von der Zusammensetzung der in willkürlicher Ausbeute abgeschiedenen Phäophytinpräparate darf also

nicht auf die Zusammensetzung des Chlorophylls in den Extrakten oder in den Blättern geschlossen werden.

Beispiele. 800 g frische Fichtennadeln (März) haben Willstätter und Isler nach ihrer Methode zur Vorbehandlung in die Mischung von 1500 ccm Holzgeist, 600 ccm Äther und 900 ccm Wasser eingelegt und darin 3 Stunden gelassen; hierauf wurden die Nadeln zentrifugiert, mit der Syenitmühle gemahlen und in der Flasche mit Alkohol angeschüttelt. Der Extrakt ist abgesaugt und mit Oxalsäure versetzt, das in kleiner Ausbeute (0,3 g) abgeschiedene Phäophytin filtriert und umgeschieden worden.

Angewandt 0,0616 g Phäophytin.

Gefunden	0,0141 g Phytochlorin e,	d. i. 22,9% vom Phäophytin.
„	0,0222 g Phytorhodin g,	d. i. 36,0% „ „
Summe	0,0363 g Spaltungsprod.,	d. i. 58,9% vom Phäophytin.

Das Komponentenverhältnis ist hiernach 0,65, das Phäophytin ist also außerordentlich reich an der Komponente b; es enthält davon $^3/_5$.

Um in einer gleichzeitigen Probe der Fichtennadeln das Komponentenverhältnis richtig zu bestimmen, werden sie an der Luft getrocknet und ihr quantitativer Extrakt ohne Ausfällung des Phäophytins auf Chlorin und Rhodin verarbeitet.

10 g Mehl lieferten 0,0118 g Phytochlorin e und 0,0038 g Phytorhodin g. Komponentenverhältnis 3,19.

Melissenmehl (ähnlich Sambucus) lieferten beim Perkolieren und bei freiwilliger Abscheidung des Phäophytins Präparate mit den Komponentenverhältnissen 1,01 und 1,48 bei Phäophytinausbeuten von 1,5 und 2,1 g pro Kilogramm.

Hingegen gaben dieselben Mehle nach der auf quantitativer Isolierung des Phäophytins beruhenden Bestimmung das Verhältnis 2,5.

Unvollständige Umscheidung.

Zu dem Einfluß des Lösungsmittels bei der ersten Abscheidung des Phäophytins gesellt sich noch ein weiterer, allerdings weniger bedeutender Fehler, nämlich eine abermalige Fraktionierung, wenn man das Phäophytin umscheidet, z. B. aus Chloroform mit Alkohol.

Verseift man das oxalathaltige Rohphäophytin, so fehlt bei der Bestimmung die Kontrolle durch die Summe der Spaltungsprodukte welche nahe an $^2/_3$ des Phäophytingewichtes betragen soll. Scheidet man aber das Phäophytin um, so wird der ausfallende Anteil wieder etwas reicher an der Komponente b.

Diese Verschiebung zeigte sich deutlich beim Behandeln mit Alkohol. Zu einer brauchbaren Methode für die Isolierung der einen oder anderen Komponente gelangt man allerdings nicht bei der fraktionierten Abscheidung aus Solvenzien, weil die beträchtlichen Löslichkeitsunterschiede der reinen Phäophytinkomponenten nicht genügend zur Geltung kommen bei ihren Gemischen. Die beiden Komponenten beeinflussen sich gegenseitig in ihrer Löslichkeit.

Beispiel. 2,5 g an Komponente b reiches Phäophytin (I) aus Sambucus wurde in 1700 ccm absolutem Alkohol bei Siedehitze gelöst; nach dem Erkalten schieden sich über Nacht 0,8 g (II) körnig-mikrokrystallinisch aus. Die Abscheidung löste man ein zweites Mal in 550 ccm absolutem Alkohol; hieraus schied sich nur sehr wenig (III) ab und das Filtrat lieferte bei mehrtägigem Stehen noch 0,2 g Phäophytin (IV).

Komponentenverhältnis von I: $1^1/_3$, II: $^2/_3$, III: $^1/_4$, IV: $^1/_3$ bis $^2/_5$.

Fehler bei der Verseifung und Fraktionierung.

Das Chlorophyll kann als solches nicht ohne Verlust in die zwei Komponenten geschieden werden und auch nicht in der Form seines magnesiumfreien Derivates. Die sehr schwach basischen Phäophytine erfordern nämlich für die Trennung Salzsäure von so hoher Konzentration, daß die Phytolestergruppe leicht angegriffen wird. Überdies würde die starke Säure mit der Rohphäophytinlösung störende Emulsionen verursachen. Deshalb wird die Trennung mit den Produkten der alkalischen Hydrolyse des Phäophytins ausgeführt, die viel stärker basisch sind (Salzsäurezahlen 3 und 9).

Die Bildung dieser Verbindungen ist aber kein einfacher Prozeß; sie erfolgt durch Hydrolyse der leicht verseifbaren Gruppe α:

$COOC_{20}H_{39}$ und der schwer verseifbaren Gruppe β: $COOCH_3$ und zugleich unter Umlactamisierung. Dabei öffnet sich in der braunen Phase eine Lactamgruppe des Phäophytins und eine neue wird geschlossen. Es ist schwierig, diesen Prozeß quantitativ in eine Richtung zu leiten. Selbst unter den günstigsten Bedingungen, beim Verarbeiten der reinen Chlorophyllide und Phäophorbide besteht immer die Gefahr, daß die Umlactamisierung untergeordnet in einer zweiten Richtung stattfindet und daß sich infolgedessen den als normal bezeichneten Spaltungsprodukten die schwach basischen, Phytochlorin g (Salzsäurezahl 11) und Phytorhodin k und i (Salzsäurezahlen ca. 15), beimischen.

Die besten Verseifungsbedingungen sind: heiß und rasch; arbeitet man verdünnt und kalt, so entsteht viel Schwachbasisches.

Chlorophyll und Chlorophyllid in Substanz können durch Eintragen in konzentrierte methylalkoholische Kalilauge beim Sieden ohne Nebenprodukt verseift und in Chlorin e + Rhodin g übergeführt werden. Aber schon bei recht geringer Verdünnung der Chlorophyllide, z. B. mit etwas Pyridin, werden die schwach basischen Spaltungsprodukte nachweisbar.

Phäophytin kann man selbst dann nicht quantitativ zu Chlorin e und Rhodin g abbauen, wenn es unverdünnt in die kochende Lauge eingetragen wird. In der Zeit bis zur vollständigen Auflösung wird schon etwas Rhodin zerstört[1]). Günstiger ist die heiße Verseifung in einer konzentrierten Pyridinlösung; Verlust an Rhodin wird vermieden, aber ein paar Prozent der schwachbasischen Derivate sind dabei unvermeidlich.

In dem Erfordernis, alles Chlorophyll eines Extraktes zur Analyse zu bringen, liegt der Nachteil, daß es nicht in reine Form gebracht werden kann, sondern daß sein magnesiumfreies Derivat mitsamt einer erheblichen Menge von Begleitstoffen isoliert und verseift wird. Diese Begleiter sind zumeist selbst verseifbar, sie erschweren die vollständige Hydrolyse auch unter energischen Bedingungen.

[1]) Eine Zeit lang ist beim Vergleich der kalten mit der heißen Verseifung die letztere wegen der Empfindlichkeit des Phytorhodins als die ungünstigere betrachtet worden (Ann. d. Chem. 380, 161 [1911]). Die Dauer war zu lang. Wird die heiße Verseifung genügend abgekürzt, so ist sie die überlegene Methode, namentlich seit der Zusatz von Pyridin gemacht wird.

Diese Schwierigkeit haben Willstätter und Isler im wesentlichen dadurch überwunden, daß sie die Spaltung des Rohphäophytins in Pyridin mit viel methylalkoholischem Kali unter kurzem Sieden ausführten. Es ist nicht verkannt worden, daß auch unter den gewählten Bedingungen der Reaktionsverlauf noch nicht ganz glatt war und daß an erheblichen Schwankungen im gefundenen Komponentenverhältnis analytische Fehler schuld tragen konnten, was in folgendem Urteil Ausdruck gefunden hat:

„Die Verhältniszahlen unserer sämtlichen Bestimmungen .... entfernen sich .... vom Mittelwert 2,57 um $\pm$ 0,4 — 0,5 mit einer durchschnittlichen Abweichung von $\pm$ 0,23. Diese Abweichungen vom Mittel um etwa 20% liegen wahrscheinlich im Bereich der möglichen Fehler. Um die Methode zur Prüfung auf feinere Differenzen in der Zusammensetzung des Chlorophylls zu verwenden, ist es erforderlich, sie noch weiter zu vervollkommnen."

Die Unsicherheit wird erstens und hauptsächlich durch den veränderlichen Betrag der schwach basischen Nebenprodukte bedingt. Bei präparativer Arbeit ist ihre Menge verschwindend, aber bei der Analyse verursachen wenige Prozente schon störende Schwankungen.

Unter gleichen Bedingungen wie im Gang der Analyse haben wir die reinen Methylphäophorbide (3 Teile a und 1 Teil b) getrennt verseift. Von Phytochlorinen blieb nach dem Ausziehen mit 3prozentiger Salzsäure noch ein Zehntel übrig, das sich bei der Bestimmung zum Rhodin schlagen würde, dieses um 25—30% vermehrend. Andererseits fehlten dem 12prozentigen salzsauren Rhodinauszug 10% schwach basisches Rhodin; um so viel wird der Fehler vermindert. Anstatt eines wahren Komponentenverhältnisses von 3 würde $2^1/_4$ bei diesem Beispiel gefunden. Natürlich fallen solche Fehler ungleich aus und nicht immer so groß wie im angeführten Falle.

Den störenden Einfluß der schwach basischen Nebenprodukte haben wir durch Verbesserung der Phäophytinhydrolyse, nämlich durch noch energischere Bedingungen für die Verseifung, auf ein Minimum herabgedrückt.

Ein zweiter Fehler in der Bestimmung ist die Unschärfe der Trennung von Phytochlorin und Phytorhodin mit 3prozentiger

Salzsäure, wenn die Fraktionierung — anders als bei präparativer Arbeit — wegen des sonst unvermeidlichen Substanzverlustes ohne Waschen ausgeführt werden muß. Dann wird immer etwas Phytorhodin in die Auszüge der stärkeren Base mit übergehen. In dem angeführten Beispiel des Methylphäophorbids b sind beim Ausziehen mit 3 prozentiger Säure, wie es die Aufarbeitung eines Gemisches fordern würde, vom Rhodin 5% verloren worden.

Dieser Fraktionierungsfehler ist in allen Analysen von Willstätter und Isler enthalten, er kompensiert teilweise den regelmäßigen Fehler bei der Verseifung. In unserem Beispiel würde infolgedessen für das Komponentenverhältnis anstatt 3 nicht $2^1/_4$, sondern 2,4 gefunden.

Im ganzen dürften infolge dieser Ungenauigkeiten die von Willstätter und Isler für das Komponentenverhältnis gefundenen Werte bis zu 20% zu niedrig ausgefallen sein.

Es gelingt, die Schwierigkeiten zu beseitigen, wenn wir als Vergleichssubstanzen anstatt gewogener Mengen von Phytochlorin und Phytorhodin Lösungen derselben anwenden, die aus einem Gemisch gewogener Mengen von Methylphäophorbid a und b durch den Gang der analytischen Trennung gewonnen werden.

c) Die Grundzüge der Methode[1]).

Das Prinzip der früheren Methode wird beibehalten, Abbau des Chlorophylls zum Phytochlorin e und Phytorhodin g, Trennung mit Salzsäure und colorimetrische Bestimmung.

Um in fertigen Präparaten von Chlorophyll oder Chlorophylliden das Komponentenverhältnis zu ermitteln, wird die alkalische Hydrolyse ausgeführt, die nur mit der festen Substanz so glatt verläuft. Die gebildeten Isochlorophyllinsalze, das sind die Magnesiumverbindungen der zwei normalen Spaltungsprodukte, werden durch Ansäuern zersetzt.

Bei der Bestimmung des verdünnten Chlorophylls eines Pflanzenextraktes verläuft die Spaltung am besten auf dem Wege über Phäophytin. Anstatt wie früher die Chlorophyllösung anzusäuern

[1]) Unveröffentlicht.

und das Phäophytin zu extrahieren, ziehen wir mit Äther das darin leichter lösliche Chlorophyll aus und zersetzen es dann erst mit Säure.

Die Verseifung des Rohphäophytins wird durch mehrere Minuten dauerndes Kochen seiner Pyridinlösung mit sehr viel hochkonzentriertem methylalkoholischem Kali unter Zusatz von Wasser ausgeführt und zwar so glatt, daß die Menge der schwach basischen Nebenprodukte nur 2—3% beträgt. In allen Fällen vergleichen wir das nach der Fraktionierung übrigbleibende schwach basische Rhodin in 17prozentiger Salzsäure colorimetrisch mit der Hauptlösung von Rhodin g; nur wenn der Betrag unter 3% bleibt, was fast immer der Fall war, ist die Analyse brauchbar.

Die wichtigste Verbesserung unserer Methode gegenüber der veröffentlichten besteht in einer Wahl der Vergleichssubstanzen, welche die noch immer unvermeidlichen Fehler der Verseifung und Fraktionierung ausschaltet. Das sind die Methylphäophorbide a und b in dem ungefähren Verhältnis des zu untersuchenden Gemisches, nämlich 1 Mol Methylphäophorbid b und 3 Mole a. Mit diesen Vergleichspräparaten führen wir im Parallelversuch die nämliche Verseifung und Fraktionierung durch und bringen dadurch dieselben Fehler in die Vergleichs- und Versuchslösung. Davon abgesehen bieten die Methylphäophorbide den Vorteil, daß sie leicht rein dargestellt werden können, haltbar sind und keinen Trockenverlust erleiden.

Fast alle Bestimmungen wurden zur Prüfung der Genauigkeit in gleichzeitigen Doppelversuchen ausgeführt.

Um außer den grünen auch die gelben Chloroplastenfarbstoffe zu bestimmen und zwar das Verhältnis von Carotin zu Xanthophyll, sowie das molekulare Verhältnis der gelben zu den grünen Farbstoffen, extrahieren wir die doppelte Blattmenge und teilen die ätherische Chlorophyllösung in Hälften. In der einen wird das Chlorophyll mit Lauge verseift und entfernt. Für die quantitative Trennung der beiden Carotinoide haben wir eine auch für den präparativen Maßstab geeignete Methode der Verteilung zwischen Petroläther und wasserhaltigem Holzgeist ausgearbeitet; sie ist fehlerfrei. In der petrolätherischen Phase bleibt das Carotin, in

die methylalkoholische geht das Xanthophyll. Für den Vergleich sind die zwei reinen Farbstoffe in denselben Solvenzien gelöst worden.

Da die Methode für die Ermittlung des Verhältnisses der Farbstoffe in der Pflanze ihre quantitative Extraktion zur Voraussetzung hat, so ergibt sie zugleich die Gewichtsmenge der einzelnen Pigmente in den Blättern.

Für die Bestimmungen standen die colorimetrischen und die spektroskopischen Methoden zur Wahl.

Wir haben den ersteren den Vorzug gegeben.

Die colorimetrische Bestimmung nötigte dazu, die Trennung der Farbstoffe und die angewandten Reaktionen des Abbaus bis zur Vollkommenheit auszuarbeiten; die analytische Arbeit steht in engem Zusammenhang mit der technischen Behandlung des Gebietes, sie wird für die präparativen Zwecke nutzbar gemacht.

Gegen die Anwendung der spektrophotometrischen Methoden spricht die komplizierte Zusammensetzung des natürlichen Pigmentgemisches, worin von der überwiegenden Komponente a die anderen Bestandteile in störender Weise optisch überdeckt werden, und ferner die Leichtveränderlichkeit der Farbstoffe, deren Absorptionsverhältnisse schon durch den Einfluß einer geringen Menge von Pflanzensäure im Extrakt erheblich geändert werden können.

Ein weiterer Grund, die weniger feine Bestimmungsweise vorzuziehen, lag darin, daß die Schwierigkeiten und Fehler bei der Verarbeitung der Pflanzen, z. B. bei der Extraktion der Farbstoffe, so bedeutend sind, daß eine Messung von großer Genauigkeit wertlos ist, ehe die grundlegenden Arbeitsmethoden für die Isolierung der Farbstoffe existieren. Nachdem diese ausgearbeitet sind, werden in Zukunft zur Verfeinerung der Bestimmung die Methoden der quantitativen Spektralanalyse heranzuziehen sein.

d) Bestimmung von Chlorophyllpräparaten[1]).

Wir ermitteln das Komponentenverhältnis und den Reinheitsgrad von Rohchlorophyll und reinen Präparaten von Chlorophyll und krystallisierten Chlorophylliden.

[1]) Unveröffentlicht.

0,050 g trockene und etwas gepulverte Substanz übergießen wir mit 5—6 ccm siedender 35 prozentiger methylalkoholischer Kalilauge; das Reagensglas war vorher auf etwa 60° angewärmt und die Lauge wird sofort wieder zum Kochen gebracht und ohne Wegdampfen von Methylalkohol in schwachem Sieden gehalten, bis das Chlorophyll klar gelöst ist. Dann erhitzt man noch $^1/_4$ Minute, kühlt ab und spült die Lauge mit Wasser in einen $^1/_2$ l Scheidetrichter. Wir säuern nun mit 20 prozentiger Salzsäure ziemlich stark an, um etwa durch Aufnahme von Zink aus dem Glase entstandene Komplexverbindung zu zersetzen. Mit $^1/_4$ l Äther wird kräftig durchgeschüttelt und die Säure mit Ammoniak abgestumpft, bis die wässerige Schicht nur noch sehr schwach blau ist. Die letzten Spuren von Chlorin lassen sich erst mit weiteren 50 ccm Äther vollständig extrahieren. Die beiden ätherischen Auszüge werden vereinigt und zur Entfernung des Methylalkohols, der die Farbnuance der salzsauren Chlorinauszüge beeinflussen würde, zweimal mit 200 ccm Wasser gewaschen.

Der Äther wird mit 3 prozentiger Salzsäure dreimal extrahiert, und zwar mit je 120 ccm, dann zweimal mit je 50 ccm 5 prozentiger Säure. Die zwei letzten Auszüge müssen für sich nochmals fraktioniert werden. Wir führen daraus die Basen wieder in 30—50 ccm Äther über und ziehen aufs neue Chlorin zwei- bis dreimal mit 3 prozentiger Säure aus. Der übrigbleibende schwach rot gefärbte Äther kommt zur Hauptlösung von Phytorhodin. Nun extrahiert man dieses mit 12 prozentiger Salzsäure, z. B. dreimal mit 120 ccm. Der übrigbleibende Äther ist je nach der Beschaffenheit des Präparates farblos oder gelb; 20 prozentige Salzsäure darf ihr keinen Farbstoff oder nur eine Spur entziehen.

Die a-Komponente liegt nun in Form des Chlorins e in äthergesättigter 3 prozentiger Salzsäure, b als Rhodin g in 12 prozentiger Säure vor und die beiden Auszüge werden mit äthergesättigter Salzsäure der entsprechenden Konzentration auf 500 ccm gebracht.

Vergleichslösungen. Mittels der Spaltungsprobe wird das Komponentenverhältnis in dem zu untersuchenden Präparat geschätzt; bei Reinchlorophyll ist es gewöhnlich $2^1/_2$. In diesem Falle mischen wir 0,0356 g Chlorophyll a und 0,0144 g Chlorophyll b

und verseifen und fraktionieren das Gemisch wie beschrieben, so daß die Volumina der Vergleichs- und Versuchslösungen gleich werden.

Den Beweis für den fehlerlosen Gang bei dieser Herstellung der Vergleichslösungen — bei den Magnesiumverbindungen verläuft die Verseifung anders als beim Phäophytin ganz einheitlich — haben wir durch colorimetrische Prüfung der Rhodinlösung mit der entsprechenden Menge abgewogenen reinen Rhodins erbracht. Wir lösten 0,0096 g mit einem Zuschlag von 0,4 mg entsprechend dem Trockenverlust in etwas Ammoniak und führten es durch Ansäuern in 300 ccm Äther über. Um genau wie bei der Fraktionierung eines Gemisches zu arbeiten, wurde die Ätherlösung zunächst mit $^1/_2$ l 3 prozentiger Salzsäure ausgeschüttelt, die schon eine Spur Substanz aufnahm, und dann mit 12 prozentiger Salzsäure extrahiert. Die so erhaltene Lösung des Phytorhodins stimmte überein mit unserer Vergleichslösung für b, die Differenz betrug nur 1% zugunsten der letzteren.

Beispiel 1. Reinchlorophyll, dargestellt aus trockenen Blättern in einer Ausbeute von 6,5 g pro kg Blattmehl.

Colorimeterschicht der Vergleichslösungen: 50 mm,
„ „ Versuchslösung a: 51,5 mm; Betrag von a = 0,0342 g,
Colorimeterschicht der Versuchslösung b: 49,5 mm; Betrag von b = 0,0146 g.

$$\text{Komponentenverhältnis} = \frac{2{,}5 \cdot 49{,}5}{51{,}5} = 2{,}40;\ \text{Reinheitsgrad } 98.$$

Beispiel 2. Reinchlorophyll, dargestellt aus frischen Blättern und zwar pro Kilogramm in einer Ausbeute von 1,6 g.

Colorimeterschicht der Vergleichslösungen: 50 mm,
„ „ Versuchslösung a: 50 mm; a = 0,0356 g,
„ „ Versuchslösung b: 56,5 mm; b = 0,0127 g.
Komponentenverhältnis = 2,82; Reinheitsgrad 97.

Für die Bestimmung der Komponenten im Phäophytin verfahren wir in analoger Weise unter Anwendung der getrennten Phäophytine oder Methylphäophorbide als Vergleichssubstanzen; die Verseifung wird bei den magnesiumfreien Verbindungen in konzentrierter Pyridinlösung ausgeführt.

3. Bestimmung der vier Blattfarbstoffe[1]).

Extraktion.

Für alle Bestimmungen haben wir die Blätter selbst gesammelt, und zwar unter Berücksichtigung der besonderen Wachstumsbedingungen: Jahres- und Tageszeit, Witterung, Sonnen- oder Schattenseite, Stellung an der Pflanze. Für Doppelversuche hat immer dieselbe Blätterprobe gedient, öfters wurden die Blätter dafür halbiert.

Willstätter und Isler haben die Mehrzahl ihrer Versuche mit getrockneten Blättern ausgeführt, nämlich mit Proben von 10 g, entsprechend einem Chlorophyllgehalt von 0,05—0,1 g. Die frisch gepflückten Blätter wurden von Stielen und Hauptrippen abgetrennt und in Mengen von 50—100 g im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Die spröde gewordenen Blätter zerkleinerte man mit einer Schneidemaschine und verwandelte sie mit einer Universalmühle in grobes Pulver; endlich wurde dieses in einer Porzellankugelmühle staubfein gemahlen.

Die Extraktion ist in der angeführten Arbeit in ganz kleinen, auf Saugflaschen aufgesetzten Perkolatoren mit Sprit ausgeführt worden. Einfacher und sicherer ist das neue Nutschenverfahren mit wasserhaltigem Lösungsmittel. 10 g Blattmehl werden auf einer Trichternutsche anfangs mit 85-, dann mit 90prozentigem Aceton etwa in 1 Stunde erschöpfend ausgezogen und geben 200 bis 300 ccm Extrakt.

Wir haben in der hier mitgeteilten neuen Versuchsreihe die Blätter stets in frischem Zustand extrahiert. Sie sind sofort nach dem Pflücken in Parallelversuchen verarbeitet und in allen Fällen zugleich für die Trockenbestimmung abgewogen worden, nämlich 40 g, die im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure nach 24 bis 48 Stunden gewichtskonstant waren.

Vor der Extraktion behandeln wir die Blätter mit wasserhaltigem Aceton, das sie weich macht und aus ihnen farblose Extraktstoffe, z. B. Pflanzensäuren beseitigt, während es vom Chlorophyll keine Spur aufnimmt. Störende Enzymreaktionen, z. B.

[1]) Unveröffentlicht.

Oxydasewirkungen, werden dadurch hintangehalten, so daß die Blattmehle am Ende fast farblos, nur schwach grau gefärbt, zurückbleiben, während sie ohne die Vorbehandlung dunkelgelb bis braun werden.

Für jeden Einzelversuch übergießen wir in einer geräumigen, innen rauhen Reibschale von ca. 25 cm Durchmesser 40 g Blätter mit 50 ccm 40prozentigem Aceton und zerreiben rasch mit 100 g Quarzsand. Dieser erleichtert nicht nur das Zerkleinern, er dient auch bei den Extraktionen als Verdünnungsmittel für die etwas schleimige Blattsubstanz. Nach dem Verreiben, wenn außer chlorophyllfreien Nerventeilen keine gröberen Blattbestandteile mehr zu erkennen sind, übergießen wir den ziemlich trockenen Brei nochmals mit 100 ccm 30prozentigem Aceton und saugen nach kurzem Anrühren auf der Nutsche durch eine dünne Talkschicht, die selbst feine Protoplasmapartikelchen zurückhält. Dann wird auch mit 30prozentigem Aceton, z. B. mit 100—200 ccm, nachgewaschen, bis das anfangs häufig braune Filtrat (bei Roßkastanie, Pappel, Buche) farblos abläuft. Zerkleinern und Vorextraktion erfordern $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde.

Das wässerige Aceton wird gut abgesaugt, und die Mischung von Blattsubstanz und Sand unter Auflockern mit dem Spatel einige Minuten lang mit reinem Aceton maceriert und wieder scharf abgesaugt. Die vollständige Extraktion mit Wiederholungen des Macerierens erfordert je nach der Beschaffenheit der Blätter und der Feinheit der Partikel 400—600 ccm Aceton, dem man gegen Ende 5—10% Wasser beimischt. Nach dem Ausziehen läuft Aceton auch bei längerer Einwirkung auf das Pulver farblos von der Nutsche ab und auch die gröberen Blattbestandteile sind entfärbt.

Der rein grüne Acetonextrakt wird in Anteilen von 100—200 ccm, wie man sie bei der Extraktion nacheinander erhält, in 200—250 ccm Äther gegossen und das Aceton mit destilliertem Wasser größtenteils herausgewaschen. Die Entfernung des Acetons wird, wenn alles Chlorophyll gesammelt ist, vervollständigt, wobei man vorsichtig umschwenkt und am Ende ohne Umschwenken das Wasser an der Wand des Scheidetrichters hinunterfließen läßt; so werden

Emulsionen vermieden. Schließlich trocknen wir mit etwas Natriumsulfat und filtrieren in einen 200 ccm Meßkolben, der bis zur Marke mit Äther aufgefüllt wird. Dann dient die Farbstofflösung in Hälften für die Bestimmung der grünen und der gelben Komponenten.

Trennung der Chlorophyllkomponenten.

100 ccm ätherischer Rohchlorophyllösung (entsprechend 20 g frischen Blättern) werden in einen Helmkolben (nach Art von Fig. 13, Kapitel XVII) gespült und mit $^1/_2$ ccm 2 n-alkoholischer Salzsäure versetzt. Dadurch wird das Chlorophyll in Phäophytin verwandelt und dieses durch den Chlorwasserstoff vor Allomerisation geschützt; daher kann die Analyse in dieser Phase über Nacht unterbrochen werden.

Wir dampfen dann den Äther im Vakuum in der Kälte ab und schließlich noch unter kräftigem Saugen mit der Pumpe ganz kurze Zeit bei 60°.

Das selten körnig, gewöhnlich wachsartig zurückbleibende Phäophytin wird in möglichst wenig Pyridin (1—2 ccm) gelöst. In einem Reagensglas mit abgesprengtem Rand bringt man 25 bis 30 ccm konzentrierte methylalkoholische Kalilauge zum Sieden, erwärmt hierauf in siedendem Wasserbad den Kolben mit der Pyridinlösung und gießt durch Einführen des Reagensglases in den Kolbenhals und Umkippen des Glases unter gleichzeitigem Umschütteln des Ganzen die siedende Lauge in den Kolben; das Sieden darf dabei nicht aufhören. Die braune Phase tritt auf und verschwindet sehr rasch und die Lösung wird olivgrün. Man setzt auf den Kolben ein Kühlrohr, kocht im Wasserbad 2 Minuten und dann weitere 1—$1^1/_2$ Minuten nach Zusatz von 5 ccm Wasser, das man durch das Kühlrohr zugibt. Nun wird der Kolben von außen am Brunnen gekühlt und der Inhalt mit Wasser und etwas Äther in einen $^1/_2$ l Scheidetrichter gespült. Wir säuern mit 20 prozentiger Salzsäure an, bis die Farbe von braun in trübe graugrün umschlägt, setzen 200 ccm Äther zu und schütteln während mehrerer Minuten kräftig durch. Die trübe wässerige Schicht wird unter Zusatz von ein wenig Ammoniak so oft mit kleinen Ätherportionen ausgeschüttelt, bis sich der Äther nicht mehr anfärbt. Die Mutterlauge machen

wir wegen der oft gebildeten Flocken mit Ammoniak alkalisch und säuern wieder an, um durch Ausäthern noch eine kleine Menge der Spaltungsprodukte zu extrahieren. Zur Kontrolle werden die Flocken nochmals mit verdünntem Ammoniak übergegossen; geht dabei wenig Farbiges in Lösung, so ist kein Rhodin durch die Verseifung zerstört worden, während sie andernfalls zu lang gedauert hat.

Die basischen Spaltungsprodukte bedürfen vor der Fraktionierung der Abtrennung von Begleitstoffen. Die vereinigten Ätherlösungen werden deshalb ausgezogen und zwar zwei- bis dreimal mit je 30 ccm 12 prozentiger Salzsäure und weiter mit je 10—15 ccm 20 prozentiger so oft, bis die sauere Schicht sich fast farblos abtrennt. An der Grenzschicht zeigen sich wieder Flocken, die aber keine Chlorophyllsubstanz mehr zu enthalten pflegen. Der Äther enthält außer den Carotinen braune Pigmente, deren Menge mit der Pflanzenart wechselt; erst starke Salzsäure vermag sie mit schmutzig grüner Farbe aufzunehmen.

Die vereinigten sauren Auszüge der Basen überschichten wir in einem $^1/_2$ l-Scheidetrichter mit 200 ccm Äther und neutralisieren sie unter leichtem Umschwenken vorsichtig mit konzentriertem Ammoniak, bis die Farbe der wässerigen Schicht trübe blauviolett wird. Dann wird der gut verschlossene Scheidetrichter unter Kühlung am Brunnen anfangs gelinde, schließlich kräftig durchgeschüttelt. Die gewöhnlich noch schwach blaue wässerige Schicht läßt man in einen zweiten Scheidetrichter fließen und zwar öffnet man, um ein Spritzen der ätherischen Lösung zu vermeiden, zuerst den Hahn und läßt von der unteren Schicht ausfließen, bis der Druck sich ausgeglichen hat. Unter fortgesetztem Neutralisieren werden die letzten Spuren der Basen in Äther übergeführt.

Die ätherische Lösung der Spaltungsprodukte, die nur bei nicht ganz guter Verseifung etwas Flocken abscheidet, wird zur Entfernung von Holzgeist und etwas Pyridin dreimal mit je 200 ccm Wasser gewaschen, aber unter Zusatz von 1—2 ccm 3 prozentiger Salzsäure, da reines Wasser Phytochlorin wegnehmen würde.

Hierauf schütteln wir in 4—5 Malen mit im ganzen 400 ccm 3 prozentiger Salzsäure aus und dann mehrmals mit etwas 5 prozentiger Säure, bis diese nur schwach grün wird. Die Auszüge mit

dieser stärkeren Säure erfordern nochmalige Fraktionierung. Sie werden unter Neutralisieren mit 30 ccm Äther extrahiert und die ätherische Lösung wiederholt mit 3 prozentiger Salzsäure ausgezogen, bis damit das Volumen der früheren 3 prozentigen salzsauren Phytochlorinauszüge auf 500 ccm gebracht ist. Der Ätherrest der Zwischenfraktion kommt zur nahezu rein roten Hauptlösung des Phytorhodins. Diese ziehen wir 4—5 mal, bis das Volumen der Auszüge auch 500 ccm beträgt, mit 12 prozentiger Salzsäure aus, wobei der Äther schwach rötlichgelb hinterbleibt.

Die Geringfügigkeit des schwach basischen Rhodins, das in 17—20 prozentigem, salzsaurem Auszug, verglichen mit der 12 prozentigen salzsauren Rhodinlösung weniger als 3% betragen muß, und die unbedeutende Menge der Flocken bestätigt den guten Gang der Verseifung und Fraktionierung. Dieses Ergebnis haben wir bei fast sämtlichen Proben erzielt, so daß die gefundenen Werte ohne Auslese im folgenden Abschnitt angeführt werden können.

Fraktionierung von Carotin und Xanthophyll.

Die zweite Hälfte der aus 40 g frischen Blättern gewonnenen ätherischen Farbstofflösungen verseifen wir mit 2 ccm konzentrierter methylalkoholischer Kalilauge unter kräftigem Schütteln zuerst mit der Hand und dann während $^1/_2$ Stunde an der Maschine. Nach einigem Stehen ist der Äther gewöhnlich rein gelb, zeigt er aber noch rote Fluorescenz, so schüttelt man weiter und setzt nötigenfalls noch etwas Lauge zu. Nach vollständiger Verseifung des Chlorophylls gießen wir die ätherische Lösung von Kaliumsalz ab in einen kleinen Scheidetrichter und waschen unter Umschwenken mit etwas Äther nach. Das genügt nicht zur Extraktion des Xanthophylls; wir setzen nochmals 30 ccm Äther zum sirupösen Chlorophyllinsalz, dann unter Umschütteln nach und nach Wasser und warten ab, bis sich die Emulsion im Scheidetrichter getrennt hat. Zur Kontrolle schüttelt man die alkalische Flüssigkeit ein zweites Mal mit Äther durch, der dabei gewöhnlich farblos bleibt.

Die sodann vereinigten ätherischen Lösungen werden mit Wasser gewaschen, dem wir etwas methylalkoholische Kalilauge zusetzen, um noch Spuren von Chlorophyllin und öfters kleine Mengen

brauner saurer organischer Substanz zu entfernen und schließlich zweimal mit reinem Wasser. Dann wird im Helmkolben der Äther im Vakuum bei gewöhnlicher Temperatur auf wenige Kubikzentimeter abgedampft, der Rückstand für die Fraktionierung mit 80 ccm Petroläther in einen Scheidetrichter gebracht und das Kölbchen mit etwas Äther nachgespült.

Für die Trennung der gelben Pigmente dienen nacheinander Entmischungen mit 100 ccm 85prozentigem, mit 100 ccm 90prozentigem und zweimal mit je 50 ccm 92prozentigem Holzgeist. Der letzte Auszug ist meistens farblos; andernfalls wiederholen wir die Extraktion mit dem 92prozentigen Methylalkohol.

Die holzgeistigen Xanthophyllauszüge sind frei von Carotin; wir vermischen sie mit 130 ccm Äther und führen den Farbstoff durch langsamen Zusatz von Wasser in Äther über. Diese ätherische Lösung des Xanthophylls und ebenso die petrolätherische des Carotins befreien wir durch zweimaliges Waschen mit Wasser vom Holzgeist, lassen sie durch trockene Filter in 100 ccm-Meßkolben laufen und versetzen sie bis zur Klärung mit einigen Tropfen absoluten Alkohols. Endlich füllen wir mit Äther bzw. Petroläther bis zur Marke auf.

Die Vergleichslösungen.

Für die Chlorophyllkomponenten. Da sich das Komponentenverhältnis auch im Falle der größten Abweichungen nicht weit von 3 entfernt, so wird bei Anwendung eines und desselben Gemisches der Methylphäophorbide zur Bereitung der Vergleichslösungen kein erheblicher Fehler begangen. Derselbe beträgt bei den divergierendsten Komponentenverhältnissen schätzungsweise 3—4% der Verhältniszahl. Das Gemisch besteht aus a und b im Verhältnis von 3 Molen zu 1 Mol, und zwar aus

0,0369 g Methylphäophorbid a,
Halbhydrat $C_{36}H_{39}O_{5^1/_2}N_4$ ($12 \cdot 10^{-5}$ Mol in 1 l)
0,0124 g Methylphäophorbid b,
wasserfreie Form $C_{36}H_{36}O_5N_4$ ($4 \cdot 10^{-5}$ Mol in 1 l).

Wir lösen das Gemisch in 2 ccm Pyridin und verseifen genau ebenso mit siedender 35prozentiger methylalkoholischer Kalilauge,

wie oben beim Phäophytin des Versuches beschrieben. Auch die Fraktionierung wird in genau derselben Weise ausgeführt, nur darf die ihr vorangehende Reinigung durch Überführen in 12—20prozentige Säure unterbleiben. Wir erhalten so wieder je 500 ccm Chlorin e in ätthergesättigter 3prozentiger und Rhodin g in 12prozentiger Salzsäure. Etwa eine Woche sind diese Lösungen brauchbar, bei noch längerem Stehen wird die Chlorinlösung ein wenig grüner, die Rhodinlösung ein bißchen gelblicher, was den colorimetrischen Vergleich etwas erschwert. In solchem Falle wiederholt man besser den Vergleich, nachdem auch die Versuchslösung einen Tag gealtert hat.

Für die gelben Pigmente. Carotin und Xanthophyll haben wir trotz der Ähnlichkeit ihrer Farbe bei der Herstellung der Vergleichslösungen einander nicht vertreten lassen, weil ihre Farbintensität ungleich ist. Die Farbintensitäten sind, wie im Kap. XII mitgeteilt wird, nicht in einem bestimmten Verhältnis verschieden, sondern das Verhältnis der Intensitäten variiert bei verschiedenen Schichtdicken in einem Lösungsmittel und bei gleichen Schichten in verschiedenen Lösungsmitteln.

Wir bereiten die Vergleichslösungen für Carotin mit Petroläther, für Xanthophyll mit Äther, und zwar aus

0,0134 g Carotin in $^1/_2$ l Petroläther, ein wenig Alkohol enthaltend ($5 \cdot 10^{-5}$ Mol in 1 l) und

0,0142 g Xanthophyll in $^1/_2$ l Äther ($5 \cdot 10^{-5}$ Mol in 1 l).

Die Carotinlösung wird in gut verschlossener Flasche im Dunkeln aufbewahrt; wir haben festgestellt, daß sie in 3 Wochen an Intensität nichts verloren hat. Die Xanthophyllösung hingegen muß jeden Tag frisch hergestellt werden, weil sie rasch ausbleicht, vielleicht infolge der Unreinheit des Äthers. Eine ätherische Vergleichslösung war nach 2 Tagen um 5, nach 3 Wochen um 60% geschwächt.

Die angewandten Präparate waren umkrystallisiert, Xanthophyll aus Methylalkohol, dann aus Chloroform, Carotin aus Alkohol, dann aus Petroläther, und ihre Reinheit durch Elementaranalysen bestätigt. Beide werden in mit Kohlensäure gefüllten, zugeschmolzenen Röhren aufbewahrt.

Ersatz für die Vergleichslösungen. Der Zeitaufwand für die Herstellung der Vergleichslösungen und die Schwierigkeit, die es dem Botaniker und dem Physiologen bietet, reine Präparate der Vergleichssubstanzen darzustellen, haben uns veranlaßt, den unbeständigen gelben Pigmenten leicht zugängliche und haltbare Farbstoffe zu substituieren. Dieser Ersatz bietet besonders für das Xanthophyll wegen der Unbeständigkeit seiner Lösungen einen großen Vorteil.

Die große Ähnlichkeit der Spektren dieser gelben Blattpigmente und von Alizarin ließ uns in diesem Handelsfarbstoff eine passende Vergleichssubstanz vermuten. Aber die Farbintensität und die Nuance des Alizarins ist zu sehr abhängig von dem Lösungsmittel und wird zu sehr beeinflußt durch Spuren von Alkalien oder irgendwelchen metallischen Verunreinigungen; so bildet sich meistens an der Wand der Glasgefäße ein störender Beschlag. Man kann daher Carotin und Xanthophyll mit dem Alizarin vergleichen (zweckmäßig eine Lösung von 0,500 g Alizarin in 200 ccm Chloroform, die man mit Äther auf 1 l verdünnt), aber als Normalsubstanz ist es nicht geeignet.

Der Vergleich mit den oben beschriebenen Normallösungen von Carotin und Xanthophyll ergibt dann bei Übereinstimmung der Farbintensität im Wolfschen Colorimeter für eine Schicht von

100 mm Carotinlösung: 126 mm Lösung des Alizarins
100 „ Xanthophyllösung: 92 „ „ „ „

In den angegebenen Lösungsmitteln ist die molekulare Farbintensität von Carotin 52 mal, von Xanthophyll 38 mal so stark wie die von Alizarin.

Eine zuverlässige Vergleichssubstanz ist Kaliumbichromat in wässeriger Lösung, wenn auch ihr Absorptionsspektrum mehr von dem einer ätherischen oder petrolätherischen Lösung von Xanthophyll oder Carotin abweicht als Alizarin in Chloroformäther.

Wir lösen 2 g Kaliumbichromat in 1 l destilliertem Wasser auf und ersetzen die Vergleichslösungen von Carotin und Xanthophyll,

wie sie für die früheren Bestimmungen verwendet wurden, in folgender Weise:

100 mm Carotinlösung entsprechen 101 mm der Bichromatlösung
50 „ „ „ 41 „ „ „
25 „ „ „ 19 „ „ „

100 mm Xanthophyllösung entsprechen 72 mm der Bichromatlösung
50 „ „ „ 27 „ „ „
25 „ „ „ 14 „ „ „

Die substituierte Vergleichslösung ist mit den beschriebenen und zwar mit solchen von verschiedenen Darstellungen von Carotin und Xanthophyll in einer Reihe colorimetrischer Bestimmungen verglichen worden.

Bei den Versuchen, deren Ergebnisse wir im folgenden anführen, hat dieser Ersatz für die eigentlichen Vergleichslösungen noch keine Anwendung gefunden.

Berechnung.

Die colorimetrischen Messungen werden mit mehreren Ablesungen ausgeführt, dann die Zylinder vertauscht und die Ablesungen wiederholt. Bei allen Bestimmungen ließen wir die als zweckmäßig erprobten Schichthöhen der Vergleichslösungen konstant, nämlich:

für Phytochlorin 40 mm, allgemein bezeichnet: h'_a
„ Phytorhodin 50 „ „ „ h'_b
„ Carotin 100 „ „ „ h'_c
„ Xanthophyll 100 „ „ „ h'_x

Die entsprechenden Schichten der Versuchslösungen (0,5 l bei den grünen, 0,1 l bei den gelben Farbstoffen) seien bezeichnet mit h_a, h_b, h_c, h_x.

Das molekulare Komponentenverhältnis der beiden Chlorophylle $\left(\frac{\text{Chlorophyll a}}{\text{Chlorophyll b}}\right)$ wird, da die Vergleichslösungen im Verhältnis von 3 Molen a : 1 Mol b hergestellt werden, berechnet als:

$$Q_{\frac{a}{b}} = 3 \cdot \frac{40}{50} \cdot \frac{h_b}{h_a} = 2{,}4 \cdot \frac{h_b}{h_a}.$$

Für das molekulare Verhältnis der zwei gelben Farbstoffe $\left(\frac{\text{Carotin}}{\text{Xanthophyll}}\right)$ ergibt sich

$$Q_{\frac{c}{x}} = \frac{h_x}{h_c}.$$

Endlich ist von Bedeutung das Verhältnis der beiden Chlorophylle zu den beiden gelben Farbstoffen, alle in Molen ausgedrückt:

$$Q_{\frac{a+b}{c+x}} = \frac{4\left(\frac{3\,h'_a}{h_a} + \frac{h'_b}{h_b}\right)}{\frac{h'_c}{h_c} + \frac{h'_x}{h_x}}.$$

Oder für die gewählte Höhe der Vergleichslösungen:

$$\frac{2\left(\frac{2{,}4}{h_a} + \frac{1}{h_b}\right)}{\frac{1}{h_c} + \frac{1}{h_x}}.$$

Die colorimetrische Bestimmung ergibt zugleich die Gewichtsmengen der vier Farbstoffe in den angewandten 20 g frischen Blättern und weiterhin in 1 kg derselben nach folgender Berechnung:

$$\text{Chlorophyll a} = 50 \cdot 0{,}00902 \cdot 6 \cdot \frac{40}{h_a},$$

$$\text{Chlorophyll b} = 50 \cdot 0{,}00916 \cdot 2 \cdot \frac{50}{h_b},$$

$$\text{Carotin} = 50 \cdot 0{,}00536 \cdot \frac{1}{2} \cdot \frac{100}{h_c},$$

$$\text{Xanthophyll} = 50 \cdot 0{,}00568 \cdot \frac{1}{2} \cdot \frac{100}{h_x}.$$

Um den Gehalt von 1 kg trockener Blätter an den vier Farbstoffen zu ermitteln, haben wir bei fast jedem Versuche den Prozentgehalt der frischen Blätter an Trockensubstanz bestimmt, welchen wir als „Trockengehalt" zu bezeichnen vorschlagen. Die für die frischen Blätter gefundenen Werte sind daher zur Berechnung des Farbstoffgehaltes der trockenen zu multiplizieren mit $\frac{100}{\text{Trockengehalt}}$.

4. Ergebnisse[1]).

Mit unserer Methode für die quantitative Bestimmung aller vier Blattfarbstoffe haben wir 20 Beispiele untersucht. Die ersten Ergebnisse dienen vielmehr dazu, die Brauchbarkeit der Analyse zu bestätigen und Fragen von physiologischer Bedeutung, die sie zu lösen gestattet, anzuregen, als etwa schon Gesetzmäßigkeiten in der Verteilung der Farbstoffe festzustellen. Dafür ist die Zahl der untersuchten Fälle noch viel zu gering. Nur die Mengenverhältnisse der grünen und gelben Pigmente und die wichtigsten Erscheinungen ihrer Verteilung lehren bereits die ersten Versuche kennen. Der Mitteilung unserer neuen Analysen sollen die früheren Beobachtungen von Willstätter und Isler, welche das Komponentenverhältnis $Q_{\frac{a}{b}}$ bei verschiedenen Pflanzen und ihren Chlorophyllgehalt betreffen, vorangestellt werden.

Das Komponentenverhältnis 2,6, das sich aus den Beispielen der Tabelle I im Mittel ergibt, ist infolge der im Abschnitt 2b erörterten Ungenauigkeiten etwas zu niedrig gefunden worden.

Tabelle I.

Zusammensetzung des Chlorophylls aus seinen beiden Komponenten nach Willstätter und Isler.

	Pflanze	Ernte	10 g getrocknete Blätter gaben		Komponentenverhältnis
			Phytochlorin e	Phytorhodin g	
1.	Fichte	21. Juli 1911	0,0124	0,0044	2,9(1)
2.	„	dieselbe	0,0124	0,0045	2,8(4)
3.	Gras	8. Juni 1911	0,0305	0,0140	2,2(4)
4.	„	22. Juni 1911	0,0313	0,0152	2,1(1)
5.	Brennessel	Ende Mai 1911	0,0357	0,0174	2,0(9)
6.	„	23. Juni 1911, an d. Sonne, 4^hN.	0,0281	0,0104	2,7(5)
7.	„	30. Juni 1911	0,0228	0,0087	2,6(7)
8.	„	20. Juli 1911, an d. Sonne, 2^hN.	0,0324	0,0110	3,0(0)
9.	„	24. Juli 1911, Schatten, 7^hV.	0,0409	0,0157	2,6(7)

[1]) Unveröffentlicht.

Tabelle I (Fortsetzung).

	Pflanze	Ernte	10 g getrocknete Blätter gaben		Komponentenverhältnis
			Phytochlorin e	Phytorhodin g	
10.	Brennessel	Mitte September 1911	0,0307	0,0140	2,3(5)
11.	„	22. März 1912, 7h V., frisch extrah.	0,0333	0,0144	2,3(7)
12.	„	dieselbe	0,0330	0,0131	2,5(8)
13.	Platane	1. Juni 1911, 5h N.	0,0316	0,0123	2,6(2)
14.	„	6. Juli 1911	0,0350	0,0152	2,3(6)
15.	„	25. Juli 1911, 9h V.	0,0504	0,0182	2,8(4)
16.	Roßkastanie	8. Juni 1911	0,0473	0,0184	2,6(3)
17.	„	4. Juli 1911	0,0421	0,0179	2,4(1)
18.	„	22. Juli 1911	0,0482	0,0167	2,9(6)
19.	„	dieselbe	0,0502	0,0171	3,0(1)
20.	Bärenklau	18. Mai 1911	0,0322	0,0122	2,7(0)
21.	„	17. Juli 1911	0,0299	0,0120	2,5(6)
22.	Melisse	19. Juli 1911	0,0290	0,0118	2,5(1)
23.	Holunder	1. Juni 1911, 5h N.	0,0396	0,0178	2,2(7)
24.	„	10. Juli 1911, 11h V.	0,0405	0,0188	2,2(0)

Tabelle II.

Chlorophyllgehalt verschiedener Pflanzen nach Willstätter und Isler.

Vers.	Pflanze	Ernte	Trockengew. von 100 g frisch. Blätt.	Gehalt von 1 kg getrock. Blättern an			Chlorophyllgeh. von 1 kg frisch. Blätt.
				Kompon. a	Kompon. b	Chlorophyll	
1	Fichte	21. Juli 1911	50	1,87	0,67	2,54	1,27
3	Gras	8. Juni 1911	28	4,62	2,10	6,71	1,88
11	Brennessel	22. März 1912	17½	5,04	2,16	7,20	1,26
6	„	23. Juni 1911	30	4,25	1,56	5,80	1,74
8	„	20. Juli 1911	34	4,90	1,66	6,56	2,23
10	„	Mitte Sept. 1911	—	4,65	2,10	6,75	—
13	Platane	1. Juni 1911	23	4,78	1,85	6,63	1,53
15	„	25. Juli 1911	24	7,63	2,73	10,37	2,49
16	Roßkastanie	8. Juni 1911	29	7,16	2,77	9,93	2,83
19	„	22. Juli 1911	34	7,29	2,50	10,18	3,46
20	Bärenklau	18. Mai 1911	20	4,87	1,83	6,70	1,34
23	Holunder	1. Juni 1911	21	5,99	2,67	8,66	1,82

Bei unseren Bestimmungen sind die Fehler auf wenige Prozente der gefundenen Verhältniszahl der Chlorophyllkomponenten herabgemindert worden; die Parallelversuche haben nämlich folgende Zahlen ergeben:

Nr. 1.	2,74	und 2,70;	Differenz	1,4 %	
„ 2.	2,83	„ 2,71;	„	4,3 „	(kleiner Fehler bei der Verseifung).
„ 3.	2,90	„ 2,80;	„	3,5 „	„ „ „ „ „
„ 10.	2,98	„ 2,90;	„	2,7 „	
„ 1a.	2,07	„ 2,05;	„	1,0 „	

Für den Quotienten $\frac{\text{Carotin}}{\text{Xanthophyll}}$ gilt das nämliche, seine Bestimmung ist sogar noch genauer als die der grünen Farbstoffe.

Nr. 1.	0,588	und	0,588;	Differenz	0,0 %
„ 2.	0,629	„	0,613;	„	2,5 „
„ 3.	0,510	„	0,513;	„	0,6 „
„ 9.	0,653	„	0,649;	„	0,6 „
„ 1a.	0,345	„	0,347;	„	0,6 „

Wenn also größere Abweichungen zwischen mehreren Analysen vorkommen, so kann es jetzt als sicher gelten, daß sie nicht mehr durch das Verfahren der Bestimmung verursacht sind, sondern daß sie natürlichen Schwankungen entsprechen. Wir halten es bei Berücksichtigung der Fehlerquellen unserer Methode auch für unwahrscheinlich, daß sie noch erhebliche Fehler mit sich bringt, die nach ein und derselben Richtung wirken und daher nicht in Differenzen bei Doppelversuchen zutage treten. Die wahren Komponentenquotienten können also nicht mehr erheblich von den gefundenen Werten abweichen.

Die Gewichtsmengen von Chlorophyll und Carotinoiden, die sich aus unseren colorimetrischen Bestimmungen ergeben haben, werden in der folgenden Tabelle III und die Komponentenverhältnisse in der Tabelle IV verzeichnet.

Farbstoffgehalt. Der Chlorophyllgehalt der Blätter verschiedener Pflanzen bewegt sich zwischen etwa 0,6 und 1,2% der Trockensubstanz und beträgt zumeist 0,8%, nämlich 0,6% Chlorophyll a und 0,2% Chlorophyll b. Wir finden viel größere Ausschläge als zwischen den verschiedenen Pflanzen bei ungleichartigen Blättern einer einzigen Pflanze. Die Schattenblätter sind, wenn man das Chlorophyll auf das Trockengewicht bezieht, viel

Tabelle III.

Gehalt der Blätter an den grünen und gelben Farbstoffen.

Nr.	Pflanze	Lebensbedingungen	Trockengehalt	Mengen (in g) in 1 kg frischer Blätter				Mengen (in g) in 1 kg trockener Blätter					
				Chlorophyll a	Chlorophyll b	Carotin	Xanthophyll	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Carotin	Xanthophyll	Gesamtchlorophyll	Summe der gelben Pigmente
1	Sambucus nigra	Lichtblätter	27,8	1,615	0,599	0,146	0,263	5,82	2,16	0,52	0,95	7,98	1,47
				1,616	0,607	0,145	0,262	5,82	2,18	0,52	0,94	8,00	1,46
2	„ „	„	24,5	1,536	0,552	0,134	0,226	6,26	2,25	0,55	0,92	8,51	1,47
				1,514	0,559	0,133	0,230	6,18	2,28	0,54	0,94	8,46	1,48
3	„ „	„	28,3	1,732	0,605	0,146	0,301	6,13	2,14	0,51	1,06	8,27	1,57
				1,725	0,628	0,144	0,298	6,10	2,22	0,51	1,05	8,32	1,56
4	Aesculus hippocastanum	„	35,5	2,517	0,885	0,291	0,444	7,09	2,49	0,82	1,25	9,58	2,07
5	„ „	„	38,5	2,477	0,890	0,291	0,444	6,44	2,31	0,76	1,15	8,75	1,91
6	„ „	„	37,5	2,123	0,873	0,298	0,466	5,66	2,33	0,79	1,24	7,99	2,03
7	Platanus acerifolia	„	32,0	1,692	0,489	0,106	0,233	5,29	1,53	0,33	0,73	6,82	1,06
8	„ „	„	35,0	1,666	0,508	0,152	0,323	4,76	1,45	0,43	0,92	6,21	1,35
9	Fagus silvatica	„	—	2,060	0,670	0,185	0,299	—	—	—	—	—	—
				—	—	0,186	0,302	—	—	—	—	—	—
10	Populus canadensis	„	33,5	1,395	0,476	0,097	—	4,16	1,42	0,29	—	5,58	—
				1,395	0,488	0,097	—	4,16	1,42	0,29	—	5,62	—
11	„ „	„	—	1,32	0,378	0,053	—	—	—	—	—	—	—
1a	Sambucus nigra	Schattenblätter	16,3	1,285	0,630	0,063	0,192	7,91	3,88	0,38	1,18	11,79	1,56
				1,304	0,645	0,063	0,192	8,02	3,97	0,39	1,18	11,99	1,57
6a	Aesculus hippocastanum	„	25,0	1,959	0,864	0,093	0,279	7,93	3,73	0,37	1,11	11,66	1,48
8a	Platanus acerifolia	„	25,0	2,112	0,679	0,127	0,311	8,45	2,70	0,51	1,25	11,15	1,76
9a	Fagus silvatica	„	37,3	2,775	0,965	0,131	0,252	7,45	2,59	0,35	0,68	10,04	1,03

Anmerkungen zur Tabelle III.

Nr. 1. 12. Juli 1912, 5 Uhr nachm., helles Wetter; tiefgrüne, dicke Blätter ohne Stiel und Mittelrippe.

Nr. 2. 15. Juli, 4 Uhr vorm., sofort nach Pflücken verarbeitet; bei der ersten von den zwei Bestimmungen ist die Verseifung etwas weniger günstig ausgefallen (1—2% zuviel Schwachbasisches).

Nr. 3. 15. Juli, 5 Uhr nachm., helles Wetter; Blätter wie bei 1 und 2; auch bei der ersten Bestimmung kleiner Verseifungsfehler.

Nr. 4. 18. Juli, 4 Uhr vorm., Blätter ohne Mittelrippen.

Nr. 5. 18. Juli, 5 Uhr nachm., bewölkt.

Nr. 6. 17. Juli, 7 Uhr vorm., hell; frische Blätter vom Gipfel der Baumkrone.

Nr. 7. 18. Juli, 4 Uhr vorm.; die Krone des Versuchsbaumes (auch von Nr. 8 und 8a) war im Frühling stark geschnitten; Blätter von im Wachstum begriffenen Sprossen, die obersten Blätter eines Zweiges nicht verwendet; bei der Verseifung etwas zu viel Schwachbasisches (auch bei Nr. 8).

Nr. 8. 18. Juli, 5 Uhr nachm., bewölkt; Blätter wie bei Nr. 7.

Nr. 9. 10. Juli, 4 Uhr nachm., hell; Blätter sehr reich an Trockensubstanz, schwierig zu zerkleinern.

Nr. 10. 8. Juli, 7 Uhr vorm., hell, Blätter vom Rande der Krone; sie sind ledern, schwer zu verarbeiten, sie färben sich ohne Behandlung mit Aceton beim Zerkleinern braun.

Nr. 11. 6. Juli, 7 Uhr vorm., hell; Stockausschläge ohne oberste Blätter.

Nr. 1a, 11. Juli, 5 Uhr nachm., hell; Blätter aus dem Innern des Strauches, sehr dünn, teilweise etwas gelblich wie absterbend.

Nr. 6a, zugleich mit Nr. 6; die Blätter aus dem Tiefinnern der Baumkrone, weich und etwas blaß.

Nr. 8a, wie 8, aber aus dem Innern der Krone, Blätter viel dünner und leichter als Lichtblätter.

Nr. 9a wie 9, Blätter ganz aus dem Innern der Baumkrone, dennoch dunkelgrün wie Lichtblätter im Gegensatz zu den Schattenblättern von Sambucus und Aesculus.

Tabelle IV.
Komponentenverhältnis der grünen und gelben Farbstoffe.

Nr.	Pflanze	Lebensbedingungen	Tageszeit	$Q\frac{a}{b}$	$Q\frac{a}{x}$	$Q\frac{a+b}{a+x}$
1	Sambucus nigra	Lichtblätter	5h N.	2,74	0,588	3,33
				2,70	0,588	3,35
2	„	„	4h V.	2,83	0,629	2,83
				2,71	0,613	2,88
3	„	„	5h N.	2,90	0,510	3,10
				2,80	0,513	3,04
4	Aesculus hippocastanum	„	4h V.	2,89	0,699	2,84
5	„	„	5h N.	2,82	0,699	2,80
6	„	„	7h V.	2,47	0,676	2,40
7	Platanus acerifolia	„	4h V.	3,52	0,478	3,98
8	„	„	5h N.	3,34	0,500	2,83
9	Fagus silvatica	„	4h N.	3,13	0,653	3,45
				—	0,649	—
10	Populus canadensis	„	7h V.	2,98	—	—
				2,90	—	—
11	„	„	7h V.	2,82	—	—
1a	Sambucus nigra	Schattenblätter	5h N.	2,07	0,345	4,63
				2,05	0,347	4,72
6a	Aesculus hippocastanum	„	7h V.	2,30	0,353	4,70
8a	Platanus acerifolia	„	5h N.	3,16	0,433	3,31
9a	Fagus silvatica	„	5h N.	2,92	0,553	6,02

reicher an Chlorophyll (nicht ebenso an Carotinoiden) als die Lichtblätter. Der Vergleich fiele allerdings anders aus, wenn man den Farbstoffgehalt auf die Blattfläche beziehen würde, da die Schattenblätter oft, z. B. bei Sambucus, Aesculus, Platanus, sehr dünn und leicht sind.

Tabelle V.
Chlorophyll (in g) in 1 kg trockener Blätter.

Nr.	Pflanze	Lichtblätter	Schattenblätter
1 und 1a	Sambucus nigra	7,99	11,89
6 „ 6a	Aesculus hippocastanum	7,99	11,66
8 „ 8a	Platanus acerifolia	6,21	11,15
9 „ 9a	Fagus silvatica	<7	10,04

Auch der Gehalt an gelben Farbstoffen, worüber noch gar keine Angabe vorliegt, bewegt sich in engen Grenzen; er beträgt nämlich bei

den geprüften Pflanzen zwischen 0,1 und 0,2% vom Trockengewicht, wovon Xanthophyll 0,07—0,12, Carotin 0,03—0,08% ausmacht.

Der Farbstoffgehalt der Blätter unterliegt in den verschiedenen Tageszeiten keiner erheblichen Schwankung; wir finden nämlich fast gleiche Farbstoffmengen, sei es, daß die Blätter zu Beginn oder gegen Ende eines Sommertages gepflückt werden.

Tabelle VI.

Farbstoff (in g) in 1 kg trockener Blätter.

Nr.	Pflanze	Chlorophyll		Carotinoide	
		4^h morgens	5^h abends	4^h morgens	5^h abends
2 und 3	Sambucus nigra	8,49	8,30	1,48	1,57
4 „ 5	Aesculus hippocastanum	9,58	8,75	2,07	1,91
7 „ 8	Platanus acerifolia	6,82	6,21	1,06	1,35

Verhältnis der Chlorophyllkomponenten. Das Mittel aus unseren Versuchen (Tabelle IV) beträgt, wenn wir die Doppelversuche mit ihren Durchschnittswerten ansetzen, 2,85 mit den größten Differenzen von $\pm$ 0,7—0,8. Diese Schwankungen, noch bedeutender als in den Bestimmungen von Willstätter und Isler, werden in ihrer Größe bedingt durch die extremen Lebensbedingungen der Blätter, die zum Vergleich herangezogen worden sind. Es scheint, daß bei einigen für Schattenwachstum schlecht organisierten Pflanzen, wie z. B. Sambucus, die Schattenblätter anormale Verhältnisse aufweisen, während eine richtige Schattenpflanze, die Buche, in ihren Schattenblättern keine erhebliche Abweichung von der gewöhnlichen Erscheinung bietet.

Wenn wir die besonders ausgesuchten Proben von Schattenblättern beiseite lassen, so ergeben die übrigen Bestimmungen des Komponentenverhältnisses, wobei wieder die Doppelversuche mit ihren Durchschnittsergebnissen nur einfach eingesetzt sind, den Mittelwert 2,93 mit den größten Abweichungen von $\pm$ 0,5—0,6. Dieser Durchschnittswert stellt also das Ergebnis der Bestimmungen mit normal lebenden Blättern dar.

Die Tageszeit ist wider Erwarten ohne Einfluß auf das Verhältnis der Farbstoffe; es ändert sich also nicht während der Assimilationstätigkeit der Chloroplasten.

Tabelle VII.

	$Q_{\frac{a}{b}}$		$Q_{\frac{a}{x}}$	
	4h morgens	5h abends	4h morgens	5h abends
Sambucus	2,77	2,85	0,621	0,512
Aesculus	2,89	2,82	0,699	0,699
Platanus	3,52	3,34	0,478	0,500

Das durchschnittliche Komponentenverhältnis der Schattenblätter ist etwas tiefer, es beträgt 2,61 mit den größten Ausschlägen von $\pm$ 0,55.

Es hat sich also gezeigt, daß die Zusammensetzung des Chlorophylls aus seinen beiden Komponenten bei verschiedenen Pflanzen und verschiedenen Wachstumsbedingungen einer und derselben Pflanze annähernd konstant, aber nicht genau konstant ist. Auf 1 Molekül Chlorophyll b treffen ungefähr 3 Mole Chlorophyll a.

Das Verhältnis $Q_{\frac{a}{x}}$ der zwei gelben Pigmente, von welchen Xanthophyll überwiegt, weist Schwankungen auf, die nicht viel beträchtlicher sind als die von $Q_{\frac{a}{b}}$.

Der Mittelwert aus allen Bestimmungen ist 0,546 mit Abweichungen von $\pm$ 0,15—0,2. In diesem Falle ergibt die Trennung der Bestimmungen von Licht- und Schattenblättern einen größeren Unterschied.

Die ersteren, also die Blätter aus normalen Lebensbedingungen, zeigen das durchschnittliche Verhältnis der gelben Komponenten 0,603 mit den größten Abweichungen von $\pm$ 0,1; auf 1 Mol Carotin treffen 1½—2 Mole Xanthophyll. Die Schattenblätter ergeben den mittleren Quotienten 0,421 mit Ausschlägen von ebenfalls $\pm$ 0,1. Zwischen dem niedrigsten und dem höchsten von den beobachteten Werten ist eine etwas größere Spannung als beim Verhältnis der Chlorophyllkomponenten.

Beziehung zwischen den grünen und gelben Farbstoffen. Schon die Angaben über die Gewichtsmengen der einzelnen Pigmente haben erkennen lassen, daß die grünen Farbstoffe

gegenüber den gelben überwiegen. Das Verhältnis des Chlorophylls (a + b) zu den gelben Pigmenten (c + x), in Molen ausgedrückt, ist

im Mittel aller Bestimmungen 3,56,
im Mittel der Bestimmungen bei Lichtblättern 3,07,
im Mittel der Bestimmungen bei Schattenblättern 4,68.

Bei den Schattenblättern mehrerer Pflanzen (Platane bildete eine Ausnahme) ist also der Quotient $\frac{a+b}{c+x}$ erheblich angestiegen bis zum Wert 6 bei einer für Schattenwachstum gut organisierten Pflanze.

Von den Chlorophyllkomponenten überwiegt stets die sauerstoffärmere, von den Carotinoiden stets die Oxydationsstufe. Aber eine einfache Beziehung zwischen $Q_{\frac{a}{b}}$ und $Q_{\frac{c}{x}}$ hat sich nicht gezeigt. Nur in einem Teil der Beispiele geht das relative Ansteigen von Chlorophyll a und Xanthophyll, der reduzierten Chlorophyllkomponente und des oxydierten Carotinoids, parallel.

5. Bestimmung der Braunalgen-Farbstoffe[1]).

Die Definition der Phäophyceenfarbstoffe ist viel umstritten. Es gilt noch als ungewiß, ob Chlorophyll als solches in den Braunalgen und in den Diatomeen vorkommt oder in der Form eines Abkömmlings von brauner Farbe, der leicht in Chlorophyll überzugehen vermag. Die schon von F. Cohn[2]) vertretene Ansicht, daß das „Phäophyll" ein dem Chlorophyll nahe verwandter Körper, vielleicht nur eine Modifikation desselben sei, haben die Untersuchungen von H. Molisch[3]) zu einer interessanten Hypothese weiterentwickelt. In den Phäophyceen und den Diatomeen soll nur ein braunes Chlorophyllderivat vorkommen, welches bei raschem Abtöten mit heißem Wasser oder in heißer Luft und bei der Einwirkung organischer Lösungsmittel in gewöhnliches Chlorophyll

[1]) Aus einer unveröffentlichten Untersuchung von R. Willstätter und H. J. Page.

[2]) Über einige Algen von Helgoland. Beiträge zur näheren Kenntnis und Verbreitung der Algen, herausgegeben von L. Rabenhorst, Heft 2, 19. Leipzig 1865. — Beiträge zur Physiologie der Phykochromaceen und Florideen. Archiv f. mikroskop. Anatomie, Bd. 3 [1867].

[3]) Botan. Ztg. 63, 131 [1905].

übergeht. Molisch vergleicht das Phäophyll mit dem braunen Farbstoff, der aus Chlorophyll sofort bei der Einwirkung von Kalilauge entsteht und so leicht weiterhin in grüne Chlorophyllderivate (Chlorophylline) übergeht.

Andere Forscher, namentlich in letzter Zeit M. Tswett[1]), F. Czapek[2]) und H. Kylin[3]), der eine kritische Untersuchung über die Farbstoffe der Fucoideen veröffentlicht hat, bestreiten die Existenz des Phäophylls. Tswett nimmt an, daß die Chlorophyllfarbe nur verdeckt sei durch die gelben Pigmente, namentlich Fucoxanthin, und daß sie in der bekannten Erscheinung des Ergrünens der Braunalgen beim Abbrühen hervorgerufen werde durch die Auflösung der Pigmente in den Fettstoffen, bei der Einwirkung von Lösungsmitteln oder Reagenzien durch Auflösung oder Veränderung des Fucoxanthins.

Es ist wohl richtiger, daß es immer die Auflösung des Chlorophylls beim Behandeln mit heißem Wasser wie mit Lösungsmitteln ist, wodurch das Ergrünen der Braunalgen hervorgerufen wird.

Willstätter und Page vollenden den Beweis, daß das Chlorophyll selbst in den Braunalgen enthalten ist. Diese zeigen im allgemeinen olivgrüne bis grünlichbraune Farbe; die Chlorophyllfarbe wird in ihnen vor allem deshalb so sehr verdeckt, weil die gelben Pigmente quantitativ überwiegen. Das molekulare Verhältnis der grünen zu den gelben Farbstoffen ist hier, anstatt 3 bis 5 : 1 wie bei vielen Landpflanzen, ungefähr 1 : 1.

Enthielten die Algen einen Farbstoff ähnlich der oft erwähnten braunen Phase des Chlorophylls, also vom Chlorophyll wahrscheinlich durch Öffnung eines Lactamringes sich unterscheidend, so würde er unter verschiedenen Einflüssen (Wärme, Lösungsmittel) nicht in das nämliche Chlorophyll, sondern je nach den Bedingungen in die Derivate der Chlorophyllin- oder Isochlorophyllinreihe übergehen. Das ist aber nicht der Fall.

---

[1]) Ber. d. deutsch. botan. Ges. 24, 235 [1906]; ferner die Chromophylle in der Pflanzen - und Tierwelt, Seite 300.

[2]) Lotos 59 [1911].

[3]) Archiv für Botanik, Stockholm, 11, Nr. 5 [1912] und Zeitschr. f. physiol. Chem. 82, 221 [1912].

Durch die spektroskopische Untersuchung wird vollends die Ansicht von Molisch widerlegt. Ein brauner Farbstoff wäre ja optisch vom Chlorophyll ganz verschieden, wie es in der Tat das Spektrum der braunen Phase ist gegenüber dem Chlorophyllspektrum. Im ersteren finden wir keine Absorption im Rot, starke im Grün und Violett (siehe Kap. VI, Abschn. 4). Das Spektrum der Braunalgen unterscheidet sich indessen gar nicht erheblich von dem der gewöhnlichen Blätter. Es gibt auch, wie die folgenden Messungen zeigen, keine bedeutende Differenz zwischen frischen und abgebrühten Braunalgen, nur sind bei den frischen die Absorptionsbänder verschwommen und zwischen ihnen ist das Spektrum verdunkelt, bei den abgebrühten sind die Absorptionsstreifen etwas gegen Violett verschoben, wahrscheinlich infolge des Übergangs von Chlorophyll aus dem kolloidalen Zustand in eine Lösung in den Fetten und Wachsen. Der ätherische Extrakt zeigt, wie der aus gewöhnlichen Blättern hergestellte, die Bänder noch bedeutend weiter gegen Violett hin verschoben.

Absorptionsspektrum.

	Fucus, frisch	Fucus, abgebrüht
Orangebraunes Stück	685—663..536—	682—665 522—
Olivfarbiges Stück	688—664.515 (etwas verstärkt um 590) 515—	683 — — 664 Schatten um 585 506—
Olivgrünes Stück	I. 695—655.. II. 641...616..610. III. 595..578. IV. 561 — — 538 —	I. 687—656...653 II. 630.610 III. 591.574 IV. 545 — — 510 —

	Ätherischer Extrakt aus Fucus	Fucus in frischem Zustand
Band I	678—647	694—661...655..
„ II	627...606	640...612.
„ III	585..574	593..579.
„ IV	545 | 525	} 555 — — 512 —
Endabsorption	509—	

Die mikroskopische Untersuchung der Braunalgen steht nach Willstätter und Page mit der spektroskopischen Beobachtung im Einklang. Schnitte der grünsten Teile von frischem Fucus (Fig. 5) zeigen nur dicht unter der farblosen Cuticula eine Reihe von Zellen, worin ein großer Teil des Pigments sich befindet, und zwar in einzelnen Körnchen in der von der Cuticula abgewandten Zellenhälfte, also anders wie bei grünen Blättern. Diese Hälfte ist olivgrün, die andere Zellhälfte ist stark lichtbrechend und höchstens schwach gelb. Nach dem Behandeln mit heißem Wasser ist das Pigment zerflossen und homogen in der ganzen Zelle enthalten, ab-

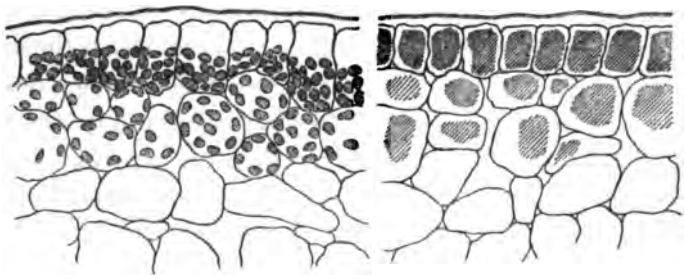


Fig. 5. Mikroskopischer Schnitt von Fucus, links in frischem, rechts in abgebrühtem Zustand.

gesehen von einem farblosen Rande, sie ist klarer und deutlicher grün. Hand in Hand mit der Änderung von Farbe und Spektrum beim Abbrühen geht also die Auflösung der Farbstoffe im öligen Inhalt der farbstoffführenden Zellen.

Schnitte von orangebraunen Fucusstücken zeigen ein anderes Bild. Hier ist die äußerste Zellreihe ziemlich vollständig von Pigment erfüllt und zwar ist in diesem Falle die äußere Hälfte tief braun, die innere öfters heller braun. Unter dieser ersten Reihe ist das Bild weniger regelmäßig; es gibt Zellen mit einzelnen, aber nicht zahlreichen olivgrünen Chlorophyllkörpern. Solche Algenstücke werden bei der Einwirkung von siedendem Wasser nur ein bißchen mehr grünlich und etwas heller; der Farbstoff ist dann in der ersten Zellenreihe gleichmäßig verteilt.

Zwischen den Bildern olivgrüner und rotbrauner Teile stehen Schnitte olivbrauner Stücke. Sie weisen in den ganzen Zellen der äußeren Reihe gelbes Pigment diffus auf, anscheinend gelöst,

während die dunklere innere Zellhälfte mehr von den Farbstoffen und zwar alles Chlorophyll in den Körnchen enthält.

Eine zweite Frage betrifft die Zusammensetzung des aus Phäophyceen extrahierten Chlorophylls.

H. C. Sorby[1]) sowie M. Tswett[2]) haben angenommen, daß darin die eine der beiden Komponenten des gewöhnlichen Chlorophylls, nämlich a, vorkomme, zusammen mit einer dritten Chlorophyllkomponente, die von Sorby Chlorofucin, von Tswett Chlorophyll γ genannt wird. Wir können dieser Ansicht zurückfolgen bis zu der grundlegenden Notiz von G. G. Stokes[3]) (1864), worin er von zwei Chlorophyllkomponenten sprach und fortfuhr:

„... but in olive-coloured seaweeds (Melanospermae) the second green substance is replaced by a third green substance, and the first yellow substance by a third yellow substance, to the presence of which the dull colour of those plants is due."

Für die angenommene dritte Chlorophyllkomponente wird von Tswett ein sehr charakteristisches Spektrum

I 638—622, II 588—575, III 465—440 $\mu\mu$ (in Äther)

angegeben, das ein scharfes Band aufweist gerade in der Lücke zwischen den Absorptionen der Chlorophylle a und b im Orange. Dasselbe Band soll sich nach Tswett im Spektrum frischer Braunalgen bei etwa 640—625 $\mu\mu$ befinden, während es gemäß der allgemeinen Verschiebung der Absorptionsbänder in den Blättern erheblich weiter gegen das rote Ende gerückt sein müßte.

Von dieser dritten Chlorophyllkomponente erhalten Willstätter und Page keine Spur bei raschem Verarbeiten frischer Braunalgen mit kalten Lösungsmitteln; obwohl es gelang, den gesamten Farbstoff in Lösung zu bringen, zeigen die Extrakte das Absorptionsband bei ungefähr 630 nicht. Nur aus nicht mehr frischen oder aus getrockneten Phäophyceen erhielten wir wiederholt Lösungen, welche dieses Chlorophyllderivat aufweisen, gebildet durch eine noch unbekannte Reaktion. Beim Liegen der Braunalgen verdarb das Chlorophyll mehr und mehr; auch im

---

[1]) Proc. Roy. Soc. **21**, 442 [1873].
[2]) Ber. d. deutsch. botan. Ges. **24**, 235 [1906].
[3]) Proc. Roy. Soc. **13**, 144 [1864].

Mehl getrockneter Braunalgen waren die Farbstoffe sehr wenig haltbar.

Die angenommene dritte Komponente ist kein natürlicher Farbstoff.

Trotz des Fehlens einer spezifischen Komponente zeigt das Chlorophyll der Phäophyceen eine sehr merkwürdige Abweichung von den Landpflanzen, sowie von den Grünalgen. Es besteht nämlich fast ausschließlich aus der Komponente a. Von Chlorophyll b sind nur Spuren zu beobachten, höchstens 5%.

Die Chlorophyllkomponente a, aus Fucoideen von Willstätter und Page isoliert, stimmt im Magnesium- und Phytolgehalt und in der Zusammensetzung der stickstoffhaltigen Spaltungsprodukte mit dem Farbstoff aus anderen Pflanzen überein.

Hinsichtlich der gelben Pigmente in den Phäophyceen sind die ersten Angaben von Stokes schon von Tswett und von Kylin berichtigt worden.

Die Braunalgen enthalten drei stickstofffreie Pigmente: Carotin, Xanthophyll (dieses soll nach Tswett vom gewöhnlichen Xanthophyll etwas verschieden sein und wird von ihm als Fucoxanthophyll bezeichnet) und Fucoxanthin (auch Phykoxanthin genannt). Die Isolierung und Analyse des Fucoxanthins wird im XII. Kapitel, Abschn. 4, mitgeteilt; es ist sauerstoffreicher als die anderen Carotinoide, seine Formel ist $C_{40}H_{56}O_6$. Dieses den Braunalgen eigentümliche Pigment ist wahrscheinlich zuerst von Stokes, dann von A. Millardet[1]) und von Sorby beobachtet, aber nicht isoliert worden; andere Forscher (Hansen, Gaidukov) haben seine Existenz bestritten. Erst Tswett und Kylin gelang es, Fucoxanthin in seiner Lösung von Xanthophyll zu trennen und die Eigenschaften der Lösung zu beschreiben.

Ein von manchen Botanikern angenommenes braunes Pigment, Phykophäin, existiert nicht in der lebenden Braunalge, was Molisch, Tswett und Kylin deutlich gezeigt haben. Bei raschem Extrahieren mit wasserhaltigem Aceton, wodurch Oxydasewirkungen ausgeschlossen werden, erhält man keinen wasserlöslichen Farbstoff und die extrahierte Pflanzensubstanz ist so gut wie farblos.

[1]) Compt. rend. 68, 462 [1869].

Die Bestimmung aller Farbstoffe der Phäophyceen nach Willstätter und Page lehnt sich an unsere allgemeine Methode der Analyse an.

Xanthophyll und Fucoxanthin lassen sich so gut wie quantitativ trennen nach einem etwas komplizierten Verfahren der Verteilung zwischen Äther-Petroläther und 70prozentigem Methylalkohol. Durch wiederholte Vornahme der Entmischung wird die Lösung des Fucoxanthins homogen, da dieses noch leichter in den wasserhaltigen Alkohol übergeht als Xanthophyll. Die zurückbleibende Mischung von Chlorophyll und gelben Farbstoffen wird wie sonst fraktioniert.

Ausführung der Analyse. Die Braunalgen werden zwischen Filtrierpapier abgedrückt und mit der Syenitwalzenmühle fein gemahlen. Von den zerkleinerten Algen wird ein Teil für die Bestimmung des Trockengewichtes verwendet und 40 g für die Extraktion. Hierfür zerreibt man das Material mit ungefähr 200 g Sand, mit noch mehr bei besonders zähen Algen, und mit 50 ccm 40prozentigem, dann mit weiteren 50 ccm 30prozentigem Aceton. Nach dem Überführen in die Nutsche und Vorextrahieren mit mehr 30prozentigem Aceton wird der gesamte Farbstoff mit wasserfreiem Aceton ausgezogen; das Filtrat ist anfangs gelb, darauf gelbgrün, blaugrün und am Ende farblos. Aus dem Extrakt ist durch Vermischen mit 300 ccm Äther und Verdünnen mit destilliertem Wasser der Farbstoff in ätherische Lösung zu bringen, die durch sehr vorsichtiges Waschen mit destilliertem Wasser vom Aceton befreit wird. Nun vermischen wir sie mit dem gleichen Volumen niedrig siedenden Petroläthers.

Zur Abtrennung des Fucoxanthins schüttelt man den Äther-Petroläther viermal mit dem gleichen Volumen petroläthergesättigtem 70prozentigem Methylalkohol aus und hält immer durch Zusatz von Äther das Volumen der oberen Schicht konstant. Da in den wasserhaltigen Holzgeist Xanthophyll mit übergegangen ist, so werden die vereinigten Extrakte einmal mit dem gleichen Volumen einer Mischung aus $^5/_6$ Vol. Petroläther und $^1/_6$ Vol. Äther gewaschen. Dabei geht aber etwas Fucoxanthin verloren; deshalb engt man diesen Auszug im Vakuum auf 250 ccm ein, vermischt

mit ebensoviel Äther und extrahiert noch zweimal mit je $^1/_2$ l petrolätherhaltigem 70prozentigem Methylalkohol. Die neuen holzgeistigen Auszüge werden zu den früheren gegeben und die ätherisch-petrolätherische Restlösung zur Hauptlösung. Das Fucoxanthin ist schließlich zur Bestimmung in 250 ccm Äther übergeführt, vom Methylalkohol durch Waschen befreit und mit einer Vergleichslösung von reinem Fucoxanthin in Äther colorimetrisch analysiert worden.

Von der petrolätherisch-ätherischen Lösung dient eine Hälfte zur Bestimmung von Chlorophyll, die andere zur Trennung von Carotin und Xanthophyll.

Ergebnis. Die Phäophyceen enthalten viel mehr gelbe Pigmente als die Landpflanzen und die Grünalgen, das molekulare Verhältnis des Chlorophylls zu den Carotinoiden entfernt sich nicht weit von 1. Unter den gelben Pigmenten überwiegt das sauerstoffreichste, das Fucoxanthin.

Gehalt der Braunalgen an Chlorophyll und Carotinoiden.

Nr.	Gattung	Zeit	Trockengehalt	Mengen (in g) in 1 kg frischer Algen				Mengen (in g) in 1 kg trockener Algen				
				Chlorophyll	Fucoxanthin	Carotin	Xanthophyll	Chlorophyll	Fucoxanthin	Carotin	Xanthophyll	Summe der gelben Pigmente
1	Fucus	Mai	28,5	0,503[1])	0,169	0,089	0,087	1,765	0,593	0,312	0,305	1,210
3	Dictyota	„	—	0,640	0,250	0,057	0,063	—	—	—	—	—
2	Laminaria[2])	Juni	15,4	0,185	0,081	0,006	0,038	1,202	0,528	0,038	0,247	0,813

Molekulares Verhältnis zwischen Chlorophyll und den gelben Farbstoffen.

Nr.	Algengattung	$Q \frac{\text{Chlorophyll}}{\text{Carotin + Xanthophyll + Fucoxanthin}}$	Carotin : Xanthophyll : Fucoxanthin
1	Fucus	0,95	1,08 : 1 : 1,75
2	Dictyota	1,20	0,77 : 1 : 3,60
3	Laminaria	1,07	0,16 : 1 : 1,92

[1]) Menge von Chlorophyll a, das Gesamtchlorophyll beträgt etwa 5% mehr.

[2]) Werte aus zwei verschiedenen Bestimmungen.

Bei den quantitativen Bestimmungen hat sich das Ergebnis der spektroskopischen Beobachtung und der präparativen Arbeit bestätigt, daß fast nur Chlorophyll a in den Braunalgen vorkommt. Nach dem Verseifen des Phäophytins und der Isolierung des Phytochlorins e im Gang der Analyse wurde stets die nur noch sehr wenig gefärbte ätherische Lösung mit 12 prozentiger Salzsäure extrahiert und dieser Auszug mit der kleinen Menge von schwach basischem Spaltungsprodukt verglichen, die bei der Herstellung der Vergleichslösung (in diesem Fall aus Methylphäophorbid a allein) auftritt. Die Fraktion in 12 prozentiger Salzsäure war beim Versuche nur sehr wenig stärker als bei der Vergleichslösung, obwohl sie beim Versuche alles vorhandene Rhodin neben etwas schwach basischem Phytochlorin enthalten mußte. Sie enthielt eben von Phytorhodin g nur eine Spur.

Zum Vergleiche mit den Braunalgen ist aus der Abteilung der Chlorophyceae als Beispiel Ulva lactuca untersucht worden. Das Verhältnis der Chlorophyllkomponenten entfernt sich hier vom durchschnittlichen Werte (ca. 3) in entgegengesetztem Sinne wie bei den Phäophyceen, indessen nicht weit. Das Chlorophyll ist nämlich relativ reich an der Komponente b. Die gelben Pigmente treten verhältnismäßig mehr hervor als bei den höheren Pflanzen, doch nicht in dem Maße wie bei den Braunalgen.

Ulva lactuca (Rovigno, Mai). Trockengehalt 17,6.

Mengen in 1 kg der frischen Alge:

0,1648 g Chlorophyll a, 0,1172 g Chlorophyll b, 0,0243 g Carotin, 0,0643 g Xanthophyll.

Mengen in 1 kg der trockenen Alge:

0,9362 g Chlorophyll a, 0,6660 g Chlorophyll b, 0,1381 g Carotin, 0,3653 g Xanthophyll.

$$Q_{\frac{a}{b}} = 1{,}43\,; \qquad Q_{\frac{c}{x}} = 0{,}40\,; \qquad Q_{\frac{a+b}{c+x}} = 1{,}96\,.$$

V. Gewinnung von Chlorophyll.

1. Methode von Willstätter und Hug[1]).

Die Grundzüge der Isolierung.

Um das Chlorophyll frei von Begleitstoffen in unversehrtem Zustand zu isolieren, war es notwendig, zuerst seine Merkmale kennen zu lernen. Dadurch sind die Anforderungen festgestellt worden, denen der Farbstoff in den einzelnen Phasen der Isolierung und im isolierten Zustand genügen muß. Zunächst sind dem Chlorophyll die gelben Pigmente der Chloroplasten beigemischt; solange sie das Chlorophyll begleiten, erhält man durch Verseifen mit alkoholischem Kali und Ausäthern gelb gefärbte Lösungen. Farblose Begleiter, Fette, Wachse und fettsaure Salze, folgen dem Chlorophyll und verteilen sich zwischen verschiedenen Lösungsmitteln in ungefähr demselben Verhältnis wie Chlorophyll; sie drücken den Magnesiumgehalt des Farbstoffes herab und geben der Asche eine Beimischung von Kalk. Die Löslichkeitsverhältnisse boten keine Handhabe für die Trennung des Chlorophylls von den Begleitern. Der Farbstoff schien in allen organischen Solventien spielend löslich zu sein.

Der Gang der Isolierung wird nun so geleitet, daß die Wirkung jeder Behandlung auf das Chlorophyll durch die colorimetrische Bestimmung seines Reinheitsgrades geprüft wird, wofür das krystallisierte Äthylchlorophyllid die Grundlage bietet. Aber das eine Prinzip hat nicht ausgereicht. Wir sind bei vielen Vorversuchen zu Chlorophyllpräparaten gelangt, die zwar nach der colorimetrischen Analyse fast 100prozentig sind, die annähernd ein Drittel

[1]) Abh. XV.

Phytol enthalten und die dennoch nicht aus unverändertem Chlorophyll bestehen. Sie unterscheiden sich nämlich vom Chlorophyll guter Blätterauszüge in zwei Eigenschaften, die dem Chlorophyll beim Stehen der Lösungen, beim Eindampfen, beim Aufnehmen mit Adsorptionsmitteln, überhaupt bei allen Operationen sehr leicht verloren gehen, ohne daß die Änderung durch einen auffälligen Unterschied im Spektrum verraten wird. Diese Änderungen sind daher auch von anderen Autoren, welche die Isolierung des Chlorophylls angestrebt haben, noch nicht beachtet worden.

Solange das Chlorophyll intakt ist, zeigt es beim Verseifen mit alkoholischem Kali den auffälligen Farbenumschlag in braun; es dauert einige Minuten, bis die Verseifung vollständig wird, und in dieser Zeit kehrt die Chlorophyllfarbe zurück. Die braune Phase fehlt den Lösungen und Präparaten, wenn sich das Chlorophyll durch eine Änderung in seiner Lactamgruppe allomerisiert hat. Diese Veränderung zeigt sich noch in einer weiteren Abweichung. Die Spaltung liefert dann nicht mehr das normale Gemisch von Phytochlorin e und Phytorhodin g, sondern schwächere Basen.

In guten alkoholischen Extrakten getrockneter Blätter ist das Chlorophyll durch ungefähr das Sechsfache an Begleitstoffen verdünnt. Die Konzentration des Farbstoffs steigt auf das Doppelte, wenn er aus dem Extrakt in Petroläther übergeführt wird. Durch Vorbehandeln der Blätter mit Lösungsmitteln, welche die Begleitstoffe, aber kein Chlorophyll extrahieren, am besten mit Benzol, gewinnt man Extrakte, die, ohne selbst einen höheren Reinheitsgrad zu besitzen, doch ein viel günstigeres Resultat beim Entmischen mit Petroläther ergeben, nämlich Chlorophyll, das nur noch weniger als das $1^1/_2$fache Gewicht anderer Stoffe mitführt. Der Reinheitsgrad läßt sich durch Waschen der petrolätherischen Rohlösung mit Holzgeist auf 60 steigern und noch höher, wenn man mit demselben Lösungsmittel, das zum Auswaschen gedient hat, den Farbstoff aus dem Petroläther extrahiert und ihn von neuem in Petroläther überführt. So erhalten wir Lösungen von 70prozentigem Chlorophyll, die durch weitere Behandlung mit Solventien nicht verbessert werden können.

Wenn das Chlorophyll diesen Reinheitsgrad erreicht hat, dann ist seine Löslichkeit von den Beimischungen nicht mehr so wie anfangs beeinflußt. Es zeigt sich jetzt überraschenderweise in Petroläther nur löslich, solange dieser Methyl- oder Äthylalkohol enthält. Wird der Alkohol quantitativ herausgewaschen, so trübt sich die Lösung, der Petroläther wird opalisierend, die Flüssigkeit enthält dann das Chlorophyll in feinstem Zustand ausgefällt. Man könnte glauben, eine verdorbene Chlorophyllösung vor sich zu haben, aber auf Zusatz von Alkohol oder Äther entsteht wieder eine prächtige grüne Lösung.

Gleichzeitig mit Willstätter und Hug[1]) ist der russische Botaniker M. Tswett[2]) in seinem Werke „Die Chromophylle in der Pflanzen- und Tierwelt" (russisch) auch zu der wichtigen Beobachtung gekommen, daß das Chlorophyll nach der Reinigung der petrolätherischen Lösung aus dieser durch Entfernen des Alkohols ausgefällt wird und in Ligroin nicht mehr löslich ist.

Diese Abscheidung aus der gereinigten Lösung ist das Wesentliche der Isolierungsmethode.

Einmal abgeschieden, läßt sich das Präparat durch Umfällen aus Alkohol mit Salzlösung und durch wiederholtes Umscheiden aus konzentrierter ätherischer Lösung mit Petroläther weiter verbessern.

Das isolierte Chlorophyll erweist sich bei rasch ausgeführten, gut gelungenen Versuchen als rein und gemäß der Prüfung mit allen bekannten Merkmalen als unverändert.

Die Ausbeute war infolge des großen Chlorophyllverlustes bei der Fraktionierung von den Begleitstoffen nur eine geringe; sie betrug etwa 5—7% vom Chlorophyllgehalt der Blätter.

Die Ausführung des Verfahrens.

Die Extrakte waren nach der Vorextraktion des Blattmehles mit Benzol und zur Verdrängung desselben durch Petroläther nach dem Nutschenverfahren mit 96prozentigem Sprit hergestellt (siehe

[1]) Ann. d. Chem. 378, 21 [1910].
[2]) Warschau 1910; Seite 206.

Kap. III, Abschn. 2a). Das Chlorophyll wurde in Petroläther übergeführt, wobei Extrakte von den Reinheitsgraden 14—17 Rohlösungen von den Reinheitsgraden 30—44 lieferten. Durch Waschen mit wasserhaltigen Alkoholen ließ sich die Chlorophyllkonzentration in der petrolätherischen Schicht steigern und zwar bis zu den Reinheitsgraden 50—60, aber nicht weiter.

Während die Entmischungen von Stokes, Sorby und Kraus stets zur Trennung der verschiedenen Pigmente gedient hatten, also für diejenigen Trennungen, die sich dem Auge verraten, erfährt hier das Entmischungsverfahren eine im Wesen neue Anwendung zur Abtrennung farbloser Beimischungen, also zur Steigerung des Reinheitsgrades.

Für die Fraktionierung der Rohchlorophyllösungen ist Holzgeist dem Äthylalkohol vorzuziehen. Chlorophyll ist schwerer in ihm löslich. Ferner ist, wie nachstehender Versuch zeigt, in wasserhaltigem Holzgeist viel weniger Petroläther löslich als in Weingeist, und man kann daher mit Holzgeist leichter und schärfer fraktionieren als mit Äthylalkohol.

Je 50 ccm absoluter Alkohol und käuflicher Methylalkohol werden mit 50 ccm Petroläther vom Siedepunkt 30—50° vermischt. Auf Zusatz von Wasser wird Petroläther in folgendem Maße abgeschieden:

Wasserzusatz	Petroläther aus der Mischung mit Methylalkohol	Petroläther aus der Mischung mit Äthylalkohol
0,7 ccm	10 ccm	0 ccm
1,0 „	20 „	0 „
3,0 „	40 „	0 „
5,0 „	45 „	22 „
10,0 „	50 „	43 „

Vor der Anwendung ist der wasserhaltige Holzgeist mit Petroläther vom Siedepunkt 30—50° gesättigt worden.

Chlorophyll und Begleitstoffe sind daher zwischen 90prozentigem Methylalkohol und Petroläther verteilt worden und zwar mit mehreren aufeinanderfolgenden Entmischungen; denn die einmal fraktionierte Petrolätherlösung ließ sich durch ein wiederholtes Waschen noch erheblich verbessern.

Zum Beispiel gab eine gewaschene Petrolätherlösung, welche 4,8 g 52prozentigen Chlorophylls in $^1/_2$ l enthielt, beim zweiten Waschen mit dem halben Volumen von 90prozentigem Holzgeist an diesen 10% ihres Chlorophylls mit dem Reinheitsgrade 19 ab. Dadurch stieg im Petroläther die Konzentration des Chlorophylls auf 60.

Noch weiter fortgesetztes Auswaschen führte aber zu einem Punkt, wo höherprozentiges Chlorophyll als das zurückbleibende in den Methylalkohol, namentlich in 95prozentigen, überzugehen begann.

Beispielsweise wurde eine gereinigte petrolätherische Lösung mit 8 g 55prozentigem Chlorophyll in 2 l angewandt und die Verteilung des Chlorophylls beim Durchschütteln mit dem gleichen Volumen petroläthergesättigten 95prozentigen Holzgeistes untersucht.

		Chlorophyll in g	Rückstand in g	Reinheitsgrad
1. Versuch:	Angew. petroläther. Lösung	8,0	—	55
	Fraktion in 95prozent. Holzgeist	3,7	5,8	64
	Petrolätherischer Rest	4,5	9,2	49
2. Versuch:	Angew. petroläther. Lösung	8,5	15,3	55
	Fraktion in 95prozent. Holzgeist	4,5	6,5	69
	Petrolätherischer Rest	4,0	8,7	46

Dieses Resultat wurde verwertet, um das Chlorophyll durch Überführen in 95prozentigen Methylalkohol und Wiederausziehen aus demselben mit Petroläther unter starkem Zusatz von Wasser endlich so rein zu erhalten, daß es sich beim vollständigen Wegwaschen des Methylalkohols ausschied.

Beispiel.

2 kg chlorophyllreiches Brennesselmehl (Chlorophyllgehalt 7 bis 8 g im Kilogramm) werden unter Saugen, aber ohne Anfeuchten, auf eine Nutsche ausgebreitet und mit 7 l Benzol extrahiert, was mit dem Maschinenvakuum in 2—3 Stunden ausgeführt ist; dann verdrängen wir in etwa 1 Stunde das vom Pulver noch zurückgehaltene Benzol durch Petroläther, wozu 2—2,5 l genügen. Nach scharfem Absaugen wird weiter auf der Nutsche im Laufe von

etwa 2 Stunden das Chlorophyll mit 3 l 96prozentigem Alkohol ausgezogen. Der Extrakt, der viel Petroläther enthält, beträgt gegen 3 l. Wir verarbeiten ihn sofort, indem wir ihn mit $^1/_2$—$^2/_3$ seines Volumens Petroläther (spez. Gew. 0,64—0,66) und dann mit $^1/_3$ seines Volumens Wasser versetzen. Bei dieser Entmischung geht der größere Teil des Chlorophylls in die obere Schicht mit schön blaustichig grüner Farbe. Die wässerig alkoholische Fraktion ist mißfarbig, hell gelbgrün und stark gelb tingierend; sie wird verworfen.

Die petrolätherische Rohlösung reinigen wir durch dreimaliges Ausschütteln mit je dem halben Volumen 90prozentigem, petroläthergesättigtem Methylalkohol. Der erste Auszug ist noch gelbstichig und tingiert gelb, der dritte ist reiner in der Farbe. Bei dieser Reinigungsoperation ist der Verlust an Chlorophyll oft nicht unerheblich.

Aus der dreimal gewaschenen Lösung wird der Farbstoff in Holzgeist übergeführt durch zweimaliges Ausziehen mit je dem gleichen Volumen (1—1,5 l) 95prozentigem Methylalkohol, der auch zuvor mit Petroläther gesättigt ist. Im Petroläther bleibt mit blaugrüner leuchtender Farbe etwas weniger als die Hälfte des Chlorophylls zurück; diese Restlösung ist wertvoll für die Gewinnung von Chlorophyllderivaten, aber zur Isolierung des Chlorophylls selbst soll nur die reinere methylalkoholische Fraktion dienen.

Hieraus bringen wir das Chlorophyll mit verdünnter Kochsalzlösung quantitativ wieder in 1 l Petroläther. Nach einmaligem Waschen mit 500 ccm 90prozentigem Holzgeist weist diese Lösung einen Reinheitsgrad von etwa 70 und 2—3 g Chlorophyllgehalt auf. Die prächtig blaustichig grüne Lösung wird mit sehr viel Wasser gewaschen, bis die grüne Farbe und die rote Fluorescenz verschwunden und die Opalescenz und Trübung eingetreten ist.

Das in äußerst feiner Verteilung ausgeschiedene Pigment wird mit viel Natriumsulfat gesammelt und mit leichtflüchtigem Petroläther nachgewaschen. Mindestens bis zu diesem Punkt ist die Arbeit an einem Tage zu führen.

Die Reinheit des Chlorophylls wird durch Umfällen aus Alkohol mit Salzlösung und weiterhin aus Äther mit Petroläther erhöht,

was in der Originalabhandlung genau beschrieben ist. Die Ausbeute beträgt $^3/_4$ g bis 1 g, aber zwei Chargen lassen sich von Anfang an nebeneinander bewältigen und bei den letzten Operationen vereinigen. Nicht alle Darstellungen liefern tadellose Präparate; es ist unerläßlich, jede einzelne zu prüfen.

2. Reinchlorophyll nach Willstätter und Stoll[1]).

Das Verfahren für die Isolierung des Chlorophylls von Willstätter und Hug ist schwierig auszuführen und liefert mit sehr großem Aufwand an Lösungsmitteln und an Zeit eine geringe Ausbeute an Chlorophyll. Die Reinheit der Präparate, gefährdet durch die lange Folge der Vornahmen in alkoholischen Lösungen, fällt nicht immer gleichmäßig befriedigend aus.

Durch die Anwendung der neuen Extraktionsmethode mit wasserhaltigem Aceton bei niedriger Schicht von Blattmehl ist das Verfahren wesentlich verändert und so verbessert worden, daß nur noch ein Gemeinsames mit der beschriebenen Methode von Willstätter und Hug geblieben ist: das Ausfallen des Chlorophylls aus der gereinigten Petrolätherlösung.

Der wasserhaltige Acetonextrakt enthält von vornherein eine bessere Chlorophyllausbeute und ist daher ein günstigeres Ausgangsmaterial; zudem ist daraus das Chlorophyll leichter und vollständiger in Petroläther überzuführen, als aus den alkoholischen Extrakten. Namentlich ist die Art der Beimischungen in den entstehenden petrolätherischen Rohlösungen eine ganz andere als bei den Extrakten mit wasserfreien oder wasserärmeren Lösungsmitteln. Die wasserhaltigen Extrakte, schlechtere Lösungsmittel für Fette und Wachse, führen gerade die störendsten Begleitstoffe nicht mit, welche die Löslichkeit des Chlorophylls in Petroläther erhöhen und die Ausfällung so sehr erschweren, daß sie erst durch die komplizierten Entmischungen möglich ist.

Daher gelingt es jetzt, einfach durch Überführen aus dem Extrakt in Petroläther und Wegwaschen des Acetons, den Farbstoff in noch unreinem Zustand zu fällen. Wir machen davon keine

[1]) Unveröffentlicht.

Anwendung, da es mit wenig mehr Arbeit möglich ist, zu reinen Präparaten zu gelangen. Es genügt eine zweimalige Reinigung der Petrolätherlösung mit 80prozentigem Aceton und wiederholtes Entmischen mit 80prozentigem Methylalkohol, wodurch Xanthophyll entfernt wird, um den Reinigungsgrad ebenso zu steigern, wie früher durch eine große Zahl von Fraktionierungen mit höherprozentigem, daher mehr Chlorophyll hinwegnehmendem Methylalkohol, sowie durch Überführen des Chlorophylls in den Methylalkohol hinein.

Die Steigerung des Reinheitsgrades bei kleinem Farbstoffverlust ergibt sich aus folgenden Zahlen:

a) Acetonextrakt aus 2 kg; b) gereinigte petroläther. Lösung.

a) 3,7 l, Chlorophyllgehalt 16,8 g, Trockenrückstand 135 g, Reinheitsgrad 12;

b) 3 l, Chlorophyllgehalt 14,3 g, Trockenrückstand 21,9 g, Reinheitsgrad 65.

Da die Isolierung ohne Fraktionierung und Zersplitterung (vgl. die „Restlösung" im Abschn. 1) des Materials erfolgt, behält das Chlorophyll das natürliche Mischungsverhältnis der Komponenten und die Ausbeute wird annähernd quantitativ, nämlich aus 1 kg Blätter so viel als bisher aus 13 kg.

Auch bleibt das Chlorophyll in den empfindlichen Gruppen des Phytochromins unverändert, da es mit Alkoholen nur wenig in Berührung kommt.

Ausführung des Verfahrens.

Die Verarbeitung von 2 kg Brennesseln bis zur Umfällung des isolierten Präparates erfordert einen halben Tag. Wir verwenden die mit Sorgfalt gesammelten und getrockneten Blätter als mittelfeines Mehl.

Auf der Steinzeugnutsche werden 2 kg mit der Pumpe festgesaugt und in $^1/_2$ Stunde mit 6—6,4 l 80volumprozentigem Aceton extrahiert. Zuerst lassen wir ohne Saugen 2 l Lösungsmittel in etwa 5 Minuten einsickern, dann füllen wir die Hauptmenge des Acetons literweise nach, indem wir abwechselnd ohne Vakuum macerieren

und mit nur mäßigem Saugen abfließen lassen. Am Ende wird das entfärbte Mehl mit kräftig wirkender Pumpe trocken gesaugt.

Aus dem schönen Extrakt wird der Farbstoff in 4 l Petroläther (0,64—0,66 von Kahlbaum) übergeführt, indem wir ihn hälftenweise im 7 l-Scheidetrichter in die ganze Petroläthermenge eingießen und unter Umschwenken je $^1/_2$ l Wasser langsam zufügen. Nach dem Ablassen der nur schwach gelblichgrünen unteren Schicht wird die petrolätherische Lösung zweimal mit je 1 l 80prozentigem Aceton entmischt; dieses nimmt Verunreinigungen, aber sehr wenig Chlorophyll weg. Die Petrolätherschicht ist durch Aufnahme von Aceton auf 6 l angewachsen. Das Aceton wird daraus vorsichtig durch viermaliges Ausziehen mit je $^1/_2$ l Wasser unter leichtem Umschwenken entfernt. Die erste von diesen Entmischungen beseitigt 0,6, die zweite 0,5, die dritte 0,4 und die letzte noch 0,2 l Aceton. Durch diese Art der Entmischung werden mit dem hochprozentig ausgeschiedenen Aceton noch Begleitstoffe beseitigt.

Wir beabsichtigen nicht, das Aceton jetzt quantitativ wegzuwaschen; sonst würde das gesamte Chlorophyll und Xanthophyll ausfallen und die Reinigung wäre schwierig. Es ist zweckmäßig, zuvor das Xanthophyll abzutrennen, was durch Ausziehen mit 80prozentigem Methylalkohol ohne zu großen Chlorophyllverlust gelingt. Wir schütteln mit je 2 l 80prozentigem Methylalkohol dreimal aus oder, wenn der letzte Auszug noch beträchtlich Gelbes enthält, ein viertes und fünftes Mal. Diese Auszüge sind leicht nebenher auf Xanthophyll zu verarbeiten; sie liefern davon 0,8 g.

Dem Petroläther, dessen Volumen schließlich 3,6 l beträgt, entziehen wir durch Waschen mit Wasser in ungefähr vier Malen mit je 2 l die letzten Anteile von Methylalkohol und Aceton. Dabei verliert der Petroläther die Fluorescenz, er trübt sich und das Chlorophyll fällt aus. Die Suspension im Petroläther schüttelt man mit etwas geglühtem Natriumsulfat und mit etwa 150 g Talk und filtriert sie durch eine Schicht von 50 g Talk mit der Pumpe. Dabei bildet die feine Ausscheidung über dem Talk leicht eine zusammenhängende Schicht und stört die Filtration; wir verrühren sie von Zeit zu Zeit mit dem Silberspatel.

Der filtrierte Petroläther ist schwach olivgrün bis gelbgrün und enthält neben wenig Chlorophyll und den öligen Stoffen viel Carotin, das daraus mit Leichtigkeit isoliert werden kann.

Der chlorophyllhaltige Talk wird auf der Nutsche zuerst mit gewöhnlichem Petroläther nachgewaschen, bis dieser nur schwach gelb abläuft und dann zur Verdrängung von schwerer flüchtigen Bestandteilen mit 300 ccm Petrolätherfraktion vom Siedepunkt 30—50°. Nun saugen wir vollständig ab und lösen sogleich auf der Nutsche das Chlorophyll mit 1 l sorgfältig destilliertem Äther aus dem Talk heraus. Die ätherische Chlorophyllösung wird durch geglühtes Natriumsulfat filtriert, auf 100 ccm konzentriert, zur Sicherheit nochmals filtriert und auf 25 ccm eingedampft. Dann fällen wir durch langsamen Zusatz von 0,8 l leichtflüchtigem Petroläther das Chlorophyll aus. Manchmal bildet der Niederschlag ein filtrierbares blauschwarzes Pulver, mitunter aber eine Suspension von so feinen Partikeln, daß man sie nur gut auf Talk filtrieren kann. Er wird dann mit Äther wieder ausgezogen und die auf 20 ccm eingeengte Lösung in einer Schale im Exsiccator zu stahlblau glänzenden dünnen Krusten eingetrocknet.

Die Mutterlauge der Umfällung hatte nicht mehr viel Beimischungen zu entfernen; sie enthielt z. B. 0,15 g Chlorophyll in 0,5 g Trockenrückstand.

Die Ausbeute betrug bei wiederholten Versuchen 13 g, also 6,5 g aus 1 kg Blätter, d. i. drei Viertel ihres Chlorophyllgehaltes. Aus der quantitativen Bestimmung in der Form von Phytochlorin und Phytorhodin ergab sich das Komponentenverhältnis 2,4 und der Reinheitsgrad 98, bei anderen Darstellungen mit kleineren Mengen ein noch höherer Reinheitsgrad.

3. Rohchlorophyll[1]).

Die bedeutende Überlegenheit der Extraktionen mit wasserhaltigem Aceton gegenüber den älteren Verfahren zeigt sich auch bei der Abscheidung von Rohchlorophyll durch Verdünnen. Willstätter und Fritzsche hatten schon die Fällung aus alkoholischen

[1]) Unveröffentlicht.

Extrakten als Ausgangsmaterial für Phyllophyllin angewandt, aber solche Produkte enthielten den Farbstoff verdünnt durch viel Begleitstoffe. Ganz anders verhält es sich mit den mittels 80volumprozentigem Aceton gewonnenen Extrakten. Schon bei sehr geringem Wasserzusatz fällt das Pigment vollständig aus mit einem Reinheitsgrad von ungefähr 50. Es ist rein genug, um vom Petroläther ausgefällt zu werden, da gerade diejenigen Begleitstoffe im wässerigen Aceton fehlen, die sonst an der Mischbarkeit des unreinen Chlorophylls mit Petroläther schuld tragen. Einmalige Umfällung aus Äther mit Petroläther genügt daher, um mit nur geringem Verlust Rohchlorophyll in einem Reinheitsgrad von etwa 90 zu gewinnen.

Das ist also ein sehr einfaches und rasches Verfahren, wodurch Chlorophyll für technische Anwendungen und viele präparative Zwecke, z. B. für die Darstellung des reinen Chlorophylls und seiner Komponenten, sowie der Phylline und Porphyrine ganz leicht zugänglich wird. Die Wiedergewinnung der Lösungsmittel ist hier viel leichter als bei der Isolierung von Reinchlorophyll, da keine Mischungen derselben entstehen.

Die Steigerung der Chlorophyllkonzentration in den 4 Phasen des Versuches machen die folgenden Zahlen anschaulich:

1 kg Brennesseln enthält 7,5 g Chlorophyll; Konzentration desselben 0,75.

1 l Extrakt enthält 7,2 g Chlorophyll; Reinheitsgrad 7,5.

14 g erste Fällung enthält 7,0 g Chlorophyll; Reinheitsgrad 50.

6,2 g Rohchlorophyll enthalten 5,9 g Chlorophyll; Reinheitsgrad 95.

2 kg Mehl selbstgesammelter Brennesseln haben wir auf der Steinzeugnutsche von 50 cm Durchmesser mit 6 l 78prozentigem Aceton in der schon beschriebenen Weise während 30—45 Minuten extrahiert. Das Mehl bleibt strohgelb zurück, höchstens in den unteren Schichten noch etwas grün.

Der Extrakt (4 l) ist an Chlorophyll, wovon er 16—17 g enthält, übersättigt und scheidet beim Stehen öfters einen Teil der Pigmente zähflüssig ab. Manchmal, z. B. bei der Verarbeitung

größerer Chargen technischer Mehle, ist es zweckmäßig, den fertigen Extrakt noch mit 80prozentigem Aceton zu verdünnen (etwa mit $^1/_6$—$^1/_3$ Volumen). Wir schütteln den Extrakt mit 300—400 g nicht zu fein gemahlenem Talk; er nimmt sogleich viel Farbstoff auf. Die Abscheidung desselben wird vervollständigt durch allmählichen Zusatz von 1,2 l Wasser; die Flüssigkeit enthält dann 40 Volumprozent Wasser und bleibt nur noch gelbgrün. Dann filtrieren wir durch eine dünne Talkschicht und zwar sofort, damit langsamer ausfallende Begleitstoffe nicht mehr zum Farbstoff kommen.

Der tief graugrüne Talk wird mit 2—3 l 65prozentigem Aceton gewaschen, wobei ziemlich viel gelber Farbstoff entfernt und nur wenig grüner verloren wird, sodann mehrere Male mit Wasser (im ganzen etwa 4 l) unter Aufrühren des Talkes. Eine Probe des Filtrats darf nicht mehr nach Aceton riechen, da dieses selbst in Spuren die Umscheidung stören würde. Nun saugen wir den Talk möglichst trocken und bringen daraus den Farbstoff durch Anschütteln in einer Pulverflasche mit Äther unter Zusatz von geglühtem Natriumsulfat in Lösung. Sie wird abgesaugt, nochmals durch Natriumsulfat filtriert und bis zur Sirupkonsistenz eingedampft. Dann wird die Masse mit wenig Petroläther vermischt und nach und nach unter Umschütteln mit viel Petroläther, im ganzen $1^1/_2$—2 l, zum großen Teil gefällt. Die Suspension setzt sich beim Stehen ab, sie ist gut filtrierbar und wird mit leichtflüchtigem Petroläther ausgewaschen.

Die Ausbeute beträgt 12—14 g und der Reinheitsgrad pflegt zwischen 90 und 95 zu liegen.

Das Präparat enthält kein Carotin, aber einige Prozente Xanthophyll. Man erhält dieses beim Verarbeiten des Rohchlorophylls auf Reinchlorophyll oder auf Chlorophyllinsalz (z. B. 1 g aus 40 g).

Die petrolätherische Mutterlauge der Umfällung enthält noch 2—3 g Chlorophyll; diesen Rest kann man durch zweimaliges Waschen mit 80prozentigem Methylalkohol, sodann mit Wasser ausscheiden und dadurch die Isolierung des gesamten Chlorophylls vervollständigen.

Das Rohchlorophyll entspricht, abgesehen von seinem Gehalt an farblosen und gelben Begleitstoffen, ebensogut den Reinheitsproben (Phasenprobe, Spaltungsprobe) wie die in den Abschnitten 1, 2, 4 beschriebenen Präparate.

4. Chlorophyll aus frischen Blättern[1]).

Die Isolierung des Chlorophylls aus frischen Blättern beschreiben wir, um zu zeigen, daß das aus den getrockneten Blättern gewonnene in unverändertem natürlichen Zustand vorliegt und um zu prüfen, ob das Pigment bei gewissen Einwirkungen auf die Blattzelle, z. B. beim Abbrühen oder beim Lagern der frisch gepflückten Blätter Veränderungen erleidet. Das Verfahren für die Verarbeitung frischer Blätter ist notwendig für die Untersuchung des Farbstoffs aus manchen Pflanzen, die sich nicht leicht unverändert trocknen lassen.

Die Extrakte mit wasserhaltigem Aceton aus frischen Blättern sind viel verdünnter als die aus trockenen, weil die lösende Wirkung der Begleitstoffe nicht ausgenützt wird. Der zum Entwässern erforderliche Vorextrakt hat viel Begleitstoffe weggeführt.

1 kg trockene Brennesselblätter geben 2 l Extrakt, enth. über 100 g Trockenrückstand;

5 kg frische Brennesselblätter geben 8 l Extrakt, enth. 45 g Trockenrückstand.

Schon die aus den konzentrierten wasserhaltigen Acetonextrakten der getrockneten Blätter in Petroläther mitgehenden Begleitstoffe waren ihrer Natur nach nicht störend für die Abscheidung des Farbstoffs. Hier bei der Verarbeitung der verdünnten Extrakte aus frischen Blättern bleibt zwar auch beim Waschen mit Aceton und Holzgeist die Menge der in Petroläther enthaltenen Beimischungen nicht gering, aber auch sie sind ohne ungünstigen Einfluß auf die Abscheidung des Chlorophylls. Es genügt durch das Ausschütteln mit Aceton und Holzgeist den Reinheitsgrad auf 50 zu bringen, um das Chlorophyll aus dem Petroläther ausfallen zu lassen.

---

[1]) Unveröffentlicht.

Acetonextrakt aus frischen Brennesselblättern enthält 4,7 g Chlorophyll, Trockenrückstand 22,6 g;

Petroläther nach Waschen mit Aceton enthält 4,5 g Chlorophyll, Trockenrückstand 11,6 g;

Mit Holzgeist gewaschen enthält er 4,2 g Chlorophyll, Trockenrückstand 9,3 g;

Petroläther nach Ausfällung enthält 0 g Chlorophyll, Trockenrückstand 4,4 g.

Beispiel. $2^1/_2$ kg frische Brennesseln haben wir rasch, nämlich in 20 Minuten, mit der Steinwalzenmühle zu dünnem Brei verarbeitet und diesen durch Anschütteln in der Flasche mit $1^1/_2$ l wasserfreiem Aceton entwässert und vorextrahiert (vgl. Kap. III, Abschn. 2c). Beim Absaugen und scharfen Abpressen liefen 2,6 l Vorextrakt ab, die 90 g Trockensubstanz enthielten. Nun extrahierten wir mit 1,2 l reinem Aceton den wieder gemahlenen Preßkuchen, dessen Wassergehalt das Lösungsmittel auf etwa 80 Volumprozent verdünnt, unter Zusatz eines weiteren Liters 80prozentigen Acetons. Beim Absaugen und Nachwaschen mit 2 l desselben Lösungsmittels gewannen wir 3,8 l Extrakt mit nahezu dem ganzen Chlorophyllgehalt der Blätter, während ein beträchtlicher Teil der gelben Pigmente in dem Blattmehl zurückbleibt; durch Nachextrahieren der Blätter mit Petroläther wurden 0,06 g reines Carotin isoliert, weitere 0,02 g lieferte die Petrolämthermutterlauge des Chlorophylls.

Den Extrakt ließen wir in $1^1/_2$ l Petroläther unter Umschwenken einlaufen, wobei sich die Schichten scharf trennten und die untere sehr wenig gefärbt blieb. Der Petroläther wurde einmal mit $^1/_2$ l 80prozentigem Aceton gewaschen und die auf 3,1 l angewachsene Schicht der Chlorophyllösung in zwei Malen mit je $^1/_2$ l Wasser von der Hauptmenge des Acetons frei gewaschen. Das Volumen betrug nun 1,7 l. Hauptsächlich zur Entfernung des Xanthophylls diente sodann Waschen mit 80prozentigem Holzgeist in zwei Malen mit je $^1/_2$ l. Wir haben aus dieser methylalkoholischen Schicht 0,15 g reines Xanthophyll isoliert.

Der Chlorophyllverlust bei allen Entmischungen war gering; die Lösung enthielt am Ende noch 4,2 g Chlorophyll und schied

dasselbe quantitativ ab bei etwa fünfmaligem Waschen mit je 2 l Wasser. Die flockige Suspension sammelten wir mit 50 g Talk, filtrierten sie auf Talk und befreiten sie von der Mutterlauge durch Waschen mit Petroläther. Nach dem Ausziehen des Chlorophylls aus dem Talk mit Äther und langsamem Ausfällen aus eingeengter Lösung mit Petroläther betrug die Ausbeute 4,05 g, d. i. reichlich vier Fünftel des in den Blättern vorhandenen Chlorophylls; das Präparat ergab bei quantitativer Bestimmung das Komponentenverhältnis 2,8 und den Reinheitsgrad 97.

In derselben Weise haben wir den Farbstoff aus 5 kg frischen Blättern gewonnen, die mit 20 l siedendem destilliertem Wasser 5 Minuten abgebrüht und aus einer Menge von $2^1/_2$ kg Brennesseln, die 4 Tage im Eisschrank gelagert worden waren. Wir haben weder im Gang der Isolierung noch in den Eigenschaften der Präparate Abweichendes gefunden.

Die geschilderte Verarbeitung hat einen halben Tag in Anspruch genommen; wenn man auf die hier erreichte hohe Ausbeute verzichtet, gelingt es den Farbstoff aus kleineren Mengen frischer Blätter durch Abkürzung aller Operationen viel rascher in reinem Zustand zu isolieren, nämlich in 45 Minuten. Das so gewonnene Chlorophyll stimmte mit den andern Präparaten gut überein; es zeichnet sich durch die Reinheit seiner Lösung und seiner Spaltungsprodukte aus.

Beispiel. 250 g frische Brennesselblätter werden mit den Syenitwalzen in 3—4 Minuten gemahlen, wobei immer eine Handvoll zweimal die Walzen passiert und sofort in 90prozentiges Aceton fällt. Wir verzichten, um Zeit zu sparen, auf die Vorextraktion und ziehen mit 1 l des Lösungsmittels in der Flasche den Brei in 2 Minuten zur Genüge aus.

Nach dem Absaugen und Nachwaschen mit $^1/_4$ l 80prozentigem Aceton läßt man das Filtrat in 300 ccm Petroläther einlaufen und wäscht die Chlorophyllösung nur zweimal mit $^1/_4$ l Wasser und zweimal mit $^1/_4$ l 80prozentigem Holzgeist. Dies genügt, um das Chlorophyll bei vollständigem Wegwaschen des Methylalkohols aus dem Petroläther zur Abscheidung zu bringen. Es wird in der üblichen Weise mit Talk aufgenommen, auf der Nutsche mit

Petroläther gewaschen und sofort auf der Nutsche mit Äther ausgezogen. Den Äther trocknen wir mit Natriumsulfat und fällen daraus nach raschem Einengen das Chlorophyll mit leichtflüchtigem Petroläther. Bis zu diesem Punkt kann man in 35—40 Minuten gelangen.

Die Ausbeute beträgt 0,25 g, während die angewandten Blätter (entsprechend 50 g getrockneten) 0,4—0,5 g Chlorophyll enthalten. Das Präparat ist frei von gelben Farbstoffen.

Rohchlorophyll aus frischen Braunalgen[1]).

Die Phäophyceen lassen sich nicht so wie Landpflanzen in trockenem Zustand verwenden.

Nach vorsichtigem Trocknen der Braunalgen und Mahlen ließen sich nur noch etwa 5% des ursprünglich darin enthaltenden Chlorophylls extrahieren und auch nicht mehr Fucoxanthin, und die kleine Menge der Farbstoffe war nicht einmal in unversehrtem Zustand. Es ist daher notwendig, die Braunalgen in frischem Zustand zu verarbeiten, entweder zu extrahieren oder wenigstens sie zur Zerstörung der Enzyme abzubrühen. Die Schwierigkeiten der Zerkleinerung und Extraktion des zähen Materials wurden durch eine Vorextraktion mit 40prozentigem Aceton überwunden, also nach unserer allgemeinen Methode der Verarbeitung frischer Blätter, die sich auch bei einem so schwer zu behandelnden Pflanzenmaterial bewährt. Bei diesem Verfahren wird viel schleimige Substanz extrahiert, so daß man nachher die Algen sehr gut zerkleinern und mit wasserärmerem Aceton allen Farbstoff ausziehen kann.

Vorzugsweise wurde Fucus virsoides aus dem Adriatischen Meere verarbeitet. Für die freundliche Versorgung mit vielen, großen Mengen der Fucoideen sind wir der Zoologischen Station der Kaiser Wilhelm-Gesellschaft in Rovigno und ihrem Leiter, Herrn Dr. Thilo Krumbach, zu aufrichtigem Danke verpflichtet.

Die Algen wurden in Mengen von 10—20 kg durch eine Walzenmühle mit Maschinenantrieb ganz grob gemahlen und sofort $^1/_4$ bis höchstens $^1/_2$ Stunde lang unter häufigem Umrühren in 40prozentiges Aceton eingelegt (2 l für je 1 kg Algen). Dann saugt man

[1]) Unveröffentlichte Angaben von R. Willstätter und H. J. Page.

auf großen Nutschen ab und entfernt noch vollständiger die schleimige Flüssigkeit mittels einer hydraulischen Presse unter einem Druck von 300 Atm. Nun läßt sich das Material zwischen den Steinwalzen viel feiner mahlen.

Die zerkleinerten Algen extrahieren wir, um zu große Verdünnung der Extrakte zu vermeiden, in Portionen entsprechend 3 kg Ausgangsmaterial fünfmal mit 85prozentigem Aceton in folgender Weise: Man füllt das Material in Filtrierstutzen, rührt es mit 3 l Lösungsmittel an und saugt auf der Nutsche ab. Das einmal ausgezogene Mehl kommt in den zweiten Filtrierstutzen, wird mit neuen 3 l Aceton angesetzt und wieder abgesaugt. Das zweite Filtrat (nicht etwa schon das erste) dient zum ersten Extrahieren der zweiten Portion. Die erste Algencharge wandert in den dritten Stutzen, ihr dritter Extrakt dient zum zweiten Extrahieren der zweiten Portion und so fort, bis jede 3 kg-Menge fünfmal ausgezogen ist. Der fünfte Extrakt jeder Charge dient zum vierten Extrahieren der folgenden, zum dritten der übernächsten usw. Aus den chlorophyllhaltigen Extrakten fällt, wenn sie in frisches Mehl kommen, Chlorophyll wieder aus, das erst bei einer folgenden Extraktion von neuem in Lösung geht. Daher sind alle ersten Auszüge gelbbraun, fast frei von Chlorophyll, sie werden nur auf Fucoxanthin verarbeitet. Alle zweiten bis fünften Extrakte, welche olivgrün, dann rein grün sind, vereinigt man (z. B. 25 l aus 20 kg) und fällt daraus in Portionen von etwa 4 l durch Anrühren mit Talk und vorsichtiges Verdünnen mit der eben erforderlichen Menge Wasser das Chlorophyll aus. Der zweckmäßige Grad der Verdünnung ist bei jedem Versuche so auszuprobieren, daß das Fucoxanthin zum größten Teile in Lösung bleibt.

Etwas Fucoxanthin geht in allen Fällen in den Talk, der deshalb auf der Nutsche zuerst mit 65prozentigem Aceton, dann einmal mit 60prozentigem Alkohol ausgewaschen wird. Die sämtlichen Filtrate dienen als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Fucoxanthin (Kap. XII, Abschn. 4), der Talk enthält das Rohchlorophyll in annähernd quantitativer Ausbeute.

Aus dem mit Talk verdünnten Chlorophyll ist Chlorophyllinkalium sowie Phäophytin und Phytol dargestellt worden.

Die Chlorophyllderivate bestehen in beinahe einheitlichen Verbindungen der a-Reihe. Es ist daher ganz richtig, daß die Braunalgen als ein von der Natur dargebotenes Ausgangsmaterial für die sogenannte blaue Chlorophyllkomponente dienen können, wofür sie zuerst H. C. Sorby[1]) empfohlen hat. Die Isolierung der Komponente a ist deshalb so einfach, weil Sorbys dritte Chlorophyllkomponente, das Chlorofucin, in der Pflanze gar nicht existiert und sich unter den hier beschriebenen Bedingungen auch nicht bildet.

Die Ausbeute an Phäophytin betrug 4,5 g aus 10 kg Fucus (nach der quantitativen Bestimmung 5 g Chlorophyll enthaltend) und an Chlorophyllinkalium 4,2 g.

5. Beschreibung des Chlorophylls[2]).

Die Anforderungen, welchen die Präparate von reinem und unversehrtem Chlorophyll genügen, ergeben sich aus folgenden Merkmalen:

1. Der Aschengehalt muß 4,5% betragen und die Asche aus reinem Magnesiumoxyd bestehen[3]).
2. Der Phytogehalt beträgt ein Drittel des Moleküls, das Phytol muß frei von festen Beimischungen sein.
3. Das Chlorophyll darf keine gelben Pigmente enthalten.
4. Bei der Verseifung mit Alkalien muß die braune Phase auftreten.
5. Die Spaltung muß das normale Gemisch von Phytochlorin e und Phytorhodin g liefern.
6. Es muß im Spektrum mit dem Blattauszug übereinstimmen.

Die Darstellungen nach der neuen Methode haben diesen Bedingungen entsprochen und die analytischen Angaben der Arbeit von Willstätter und Hug sind mit den neuen Präparaten ergänzt und verbessert worden.

Da die Zusammensetzung der beiden Komponenten des Chlorophylls infolge der Hydratbildung von Chlorophyll a keinen deutlichen

[1]) Proc. Roy. Soc. 21, 452 [1873].
[2]) Ann. d. Chem. 380, 204 [1911].
[3]) Die Asche enthält keinen Phosphor, die Angaben von J. Stoklasa über Phosphor- und Kaliumgehalt des Chlorophylls sind unrichtig.

Unterschied zeigen, so weichen bei dem Gemisch von a und b die Werte nur wenig von der Berechnung für die Komponente a ab.

Chlorophyll a (Halbhydrat): $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg + {}^1/_2 H_2O$.

Berechnet für	$C_{55}H_{72}O_{5\,1/2}N_4Mg$	Gefunden[1])
C	73,17	73,53
H	8,15	8,09
N	6,21	6,14
Mg	2,70	2,60
OCH_3	3,44	3,33
Phytol	32,85	32,1

Empfindlicher als die Analyse lassen die folgenden Reaktionen darüber urteilen, ob das Chlorophyll rein ist und ob die leicht veränderlichen Gruppen des Moleküls unversehrt sind.

Phasenprobe. Die ätherische Lösung wird mit methylalkoholischer Kalilauge geschüttelt; dabei schlägt die Farbe in reines Braun um[2]); dann kehrt in einigen Minuten in dem alkalischen Medium die ursprüngliche Chlorophyllfarbe zurück.

Die Phase tritt nicht auf bei allomerisiertem Chlorophyll und ist trübe braun bei Mischungen.

Wird beim Auftreten der braunen Phase sofort viel Wasser zugefügt, so geht die Hauptmenge wieder als grüner Farbstoff in den Äther. Dann ist das regenerierte Chlorophyll merkwürdigerweise vollkommen unversehrt, nicht etwa allomerisiert; es gibt von neuem mit methylalkoholischem Kali die braune Phase und es lassen sich aus ihm die normalen Spaltungsprodukte gewinnen. Setzt man aber zur alkalischen Schicht erst nach der Rückbildung der grünen Farbe Wasser hinzu, so färbt sich der Äther nicht mehr grün an.

Prüfung auf gelbe Pigmente. Bei der Phasenprobe muß der Äther farblos werden. Sind aber Carotin und Xanthophyll vorhanden, so gehen sie zum Teil in die alkalische Schicht und werden erst durch langsamen Zusatz von Wasser in den Äther übergeführt, vollständig bei wiederholtem Ausäthern der alkalischen Flüssigkeit.

Das Fehlen der am hartnäckigsten folgenden gelben Begleiter in einem Präparat zeigt nach den Erfahrungen bei der Bestimmung

[1]) Unveröffentlicht.

[2]) Diese Reaktion ist früher und wohl zuerst beobachtet worden von H. Molisch, Ber. d. d. bot. Ges. 14, 16 [1896].

des Reinheitsgrads auch an, daß es frei von farblosen Beimischungen ist.

Spaltungsprobe. Wir übergießen einige Milligramme der gepulverten Substanz mit 3—4 ccm siedender, konzentrierter methylalkoholischer Kalilauge und setzen das Kochen einige Minuten fort mit der Vorsicht, daß die Flüssigkeit nicht zu weit eingedampft und dadurch die Isochlorophylline zu einfacheren Phyllinen abgebaut werden. Nach schwachem Ansäuern extrahiert man die Basen mit 30 ccm Äther und zieht zuerst mit 4 prozentiger Salzsäure das Phytochlorin e, sodann mit 9 prozentiger das Phytorhodin g aus. Nun darf im Äther nur noch ein wenig Rhodin g übrig sein; der Äther wird dann mit 12 prozentiger Salzsäure farblos und man erhält beim Neutralisieren der Lösung und Ausschütteln mit wenig Äther eine konzentriertere schön rote Rhodinlösung. Enthält aber das Präparat allomerisiertes Chlorophyll, so ist schwachbasisches Phytochlorin vorhanden und dieses macht die letzte Phytorhodinfraktion mißfarbig.

Prüfung auf vollständigen Phytolgehalt (Basizitätsprobe). Die Phytolestergruppe kann durch Alkoholyse oder Hydrolyse angegriffen sein. Bei der Verarbeitung von Blättern mit erheblichem Chlorophyllasegehalt kommt nämlich die Bildung von etwas freiem Chlorophyllid vor beim Extrahieren mit wasserhaltigem Aceton, die Beimischung von Alphylchlorophyllid beim Extrahieren mit Alkohol.

Weit empfindlicher als die quantitative Phytolbestimmung ist die Prüfung der ätherischen Lösung mit 22 prozentiger Salzsäure, welche die einfachen Chlorophyllide extrahiert.

Auf freies Chlorophyllid kann man die ätherische Lösung mit $n/_{100}$-Kalilauge prüfen.

Prüfung auf unversehrten Magnesiumkomplex. Wenn Chlorophyll durch die Wirkung von Säure leidet, so verrät sich die Beimischung von Phäophytin im Spektrum durch das Auftreten der Absorptionsbänder vor der Fraunhoferschen Linie E und zwischen den Linien E und F.

Das Chlorophyll zeigt weder saure noch basische Eigenschaften; es ist empfindlich gegen Säure und Alkalien.

Bei der Einwirkung von Säuren erleidet es sofort den Farbumschlag in olivbraun, indem es das Magnesium verliert. Auf Zusatz von Oxalsäure zur alkoholischen Lösung wird die Farbe kurze Zeit olivgrün, und es fällt eine Verbindung in olivfarbigen Flocken aus, die sich erst beim Stehen in Phäophytin umwandeln. Mit Pikrinsäure entsteht kein Pikrat, sondern das Chlorophyll wird zersetzt und gibt eine braune Lösung.

Das Chlorophyll in Substanz ist blaustichig schwarz, mit starkem, fast metallischem Reflex. Es läßt sich im trockenen Zustand sehr leicht und fein zerkleinern zu matt grünstichig- oder blaustichig-schwarzem Pulver. Unter dem Mikroskop erweist sich das Chlorophyll als krystallinisch, mitunter sogar deutlich als Krystallaggregat, so daß man am Rande von Drusen scharfe Begrenzungen sieht. Einzeln ausgebildet kamen aber die Krystalle nicht vor.

Die Substanz besitzt keinen scharfen Schmelzpunkt, die Temperatur des Schmelzens ist von der Art des Erhitzens abhängig. Bei langsamem Erhitzen auf 100°, z. B. beim Trocknen, sintert die Substanz, sie gibt dann beim Erkalten eine spröde, schwarze Masse mit nicht merklich veränderten Eigenschaften. Beim Erwärmen im Schmelzpunktsröhrchen zerfließt das Chlorophyll zu zähen Tropfen, bald etwas unter 100°, bald etwas darüber; bei mehreren Bestimmungen fanden wir die Schmelzpunkte 93—96° und 103—106°.

Das Chlorophyll ist in absolutem Alkohol leicht löslich mit blaustichig-grüner Farbe, etwas schwerer in 95 prozentigem Alkohol sowie in Methylalkohol, schwer in 90 prozentigem Holzgeist. In Äther löst es sich im Gegensatz zum Äthyl- und Methylchlorophyllid spielend leicht und gibt eine prächtige blaugrüne Lösung, die stark fluoresciert; sie ist blaustichiger als die alkoholische. Überraschend ist das Verhalten gegen Petroläther; das Chlorophyll ist darin in der Kälte außerordentlich schwer löslich, warm ist es ein wenig löslich. Hingegen ist es auf Zusatz von ein wenig Äthyl- oder Methylalkohol darin leicht löslich. Hexan aus Petroleum (Kahlbaum) löst das Chlorophyll ziemlich leicht, Petroläther fällt es aus dieser Lösung aus; in Hexan aus Propyljodid zeigt es sich dagegen ebenso unlöslich wie im Petroläther.

Benzol löst sehr leicht, Cyclohexan leicht, auch Chloroform und Schwefelkohlenstoff, letzterer mit grüner Farbe, weniger blau als die anderen Solvenzien. In Pyridin ist die Substanz spielend löslich.

Entmischung nach Kraus. Das isolierte Chlorophyll zeigt trotz seiner Unlöslichkeit in reinem Petroläther die Verteilung zwischen Petroläther und Alkohol, wie sie seit den grundlegenden Versuchen von Stokes und Kraus für den Farbstoff des Blätterextrakts bekannt ist; das Verhalten ist eine Folge der Löslichkeit in alkoholhaltigem Petroläther. Beim Entmischen mit wenig Wasser erfolgt eine ungefähr gleichmäßige Verteilung des Farbstoffs zwischen den beiden Schichten. Auf Zusatz von viel Wasser oder bei nochmaligem Ausschütteln mit reinem Petroläther ist die wässerig-alkoholische Schicht nur noch ganz schwach gelblichgrün gefärbt.

Für 0,1 prozentige äthyl- und methylalkoholische Lösungen haben wir durch colorimetrische Bestimmung die Entmischungsverhältnisse ermittelt.

a) 25 ccm alkoholische Lösung werden mit 25 ccm Petroläther versetzt und mit 5 ccm Wasser entmischt; die beiden Schichten erscheinen annähernd gleich. Nach der colorimetrischen Bestimmung enthält der Petroläther 44% vom Farbstoff.

b) Bei dem gleichen Versuch unter Anwendung von Methylalkohol enthält die petrolätherische Lösung 56% des Chlorophylls. Die holzgeistige Schicht wird nochmals mit 25 ccm Petroläther versetzt; derselbe entzieht der unteren Schicht den Farbstoff fast quantitativ.

Aus dem Petroläther scheiden sich beim Stehen über der verdünnt alkoholischen Schicht keine Krystalle aus, im Gegensatz zum Versuch mit Äthylchlorophyllid.

Veränderung in alkoholischer Lösung (Allomerisation)[1]).

Chlorophyll unterliegt in alkoholischen Lösungen, namentlich in den wasserfreien Solvenzien einer Umwandlung welche die Isolierung und Reinigung außerordentlich erschwert hat. Auch die

[1]) Ann. d. Chem. 382, 135 [1911] und 387, 325 und 357 [1912].

einfachen Alphylderivate erleiden diese Veränderung, besonders rasch die freien Chlorophyllide. Dabei verlieren die Chlorophyllide ihre Krystallisationsfähigkeit, sie zeigen nicht mehr die braune Phase und liefern nicht die normalen, sondern schwach basische Spaltungsprodukte. Diese Umwandlung bezeichnen wir als Allomerisation[1]); wir versuchen sie als Öffnung der Lactamgruppen und Bildung neuer Lactamgruppen zu erklären.

Es war von großer praktischer Wichtigkeit, die Ursache der Allomerisation aufzufinden und ihren Eintritt zu verhüten; wir haben darüber vorzugsweise mit Methylchlorophyllid Versuche angestellt. Durch etwas Wasser werden die Chlorophyllide in der alkoholischen Lösung einigermaßen geschützt schon durch 2%, aber die wasserhaltigen Lösungsmittel lösen die Alkylchlorophyllide zu wenig.

Die Lösung von Methylchlorophyllid in absolutem Alkohol gab nach 10 Stunden nur noch einen schwachen Farbumschlag mit Ätzkali, nach 24 Stunden keinen mehr; bei Zusatz von 5% Wasser war die braune Phase nach 2 Tagen noch sehr deutlich und erst nach 5 Tagen verschwunden.

In Äther, Chloroform und wasserfreiem Pyridin tritt die Veränderung nicht ein; ätherische Lösungen von Phytyl- und Methylchlorophyllid a blieben in Glasgefäßen 3 Wochen lang unverändert.

Die Allomerisation wird in der alkoholischen Lösung durch Glas katalytisch begünstigt. Sie unterbleibt in Platin- und Silbergefäßen.

Eine absolut alkoholische Lösung von Methylchlorophyll b war in einem Probierrohr von Platin nach 5 Tagen ganz unverändert, während sie im Glasgefäß unter Lichtabschluß nach 24 Stunden die braune Phase nicht mehr gab und eine matter grüne Farbe zeigte.

Indessen ist diese Erscheinung nicht einfach auf die Alkalinität des Glases zurückzuführen, denn im Reagierrohr aus reinem Bergkrystall trat die Allomerisation gleichfalls ein. (Methylchlorophyllid b, $^1/_{1000}$ Mol in 1 l Äthylalkohol, ist darin in 24 Stunden fast

---

[1]) Der Name ist davon abgeleitet, das sich bei dieser Erscheinung reaktionsfähige Teile anders im Molekül gruppieren. Da die Zusammensetzung der veränderten (allomeren) Chlorophyllide nicht genau bekannt ist, kann man nicht wohl von Isomerie sprechen.

quantitativ allomerisiert worden, etwas langsamer als im Glase.) Auch ist das Methylchlorophyllid b durch $^1/_{1000000}$ n-KOH in absolutem Alkohol im Platingefäß in 24 Stunden nicht merklich, hingegen in einer Bergkrystallflasche größtenteils verändert worden.

Wenn also die Allomerisation nicht einfach als eine Katalyse durch kleine Mengen von Alkalien erklärt werden kann, so gelingt es uns dennoch, sie gänzlich hintanzuhalten durch Zusatz der geringsten Menge einer Säure. Die absolut-alkoholische Lösung eines Methylchlorophyllides versetzen wir z. B. mit einer Spur alkoholischer Oxalsäurelösung. Die Farbe und Phase war nach mehreren Tagen, sogar nach 3 Wochen unverändert; ein Kontrollversuch in rein alkoholischer Lösung gab die Phase schon nach einem Tage nicht mehr, bei einem zweiten Vergleichsversuch mit Zusatz einer Spur Kaliumhydroxyd ging die Phase schon in einigen Stunden verloren.

Die früher rätselhafte Erscheinung, daß Chlorophyll und Chlorophyllide in reinen Lösungen große Veränderlichkeit zeigen, aber nicht in den Extrakten, ist nun erklärt. Die Extrakte enthalten Wasser und häufig Spuren organischer Säuren.

Durch den Schutz mittels sehr kleiner Mengen von Säure, zweckmäßig 0,01 g Oxalsäure in 1 l Alkohol, wird nunmehr die Verarbeitung der empfindlichen Magnesiumverbindungen, namentlich die in den Kapiteln VI und X beschriebene Trennung in die Komponenten, sehr erleichtert und die Isolierung der reinen Substanzen gewinnt an Sicherheit.

6. Vergleichende Untersuchung des Chlorophylls verschiedener Pflanzen[1]).

Die Kenntnis der Merkmale und der Zusammensetzung des Chlorophylls bot die Grundlage für den Vergleich des Chlorophylls verschiedener Pflanzen.

Die älteren Ansichten über die Identität oder Verschiedenheit des Blattfarbstoffs verschiedener Pflanzen gingen weit auseinander und stützten sich nicht auf die chemische Analyse.

---

[1]) Abh. VII, X, XIV.

A. Gautier[1]) hat in seiner Abhandlung: „Sur la pluralité des chlorophylles" das Chlorophyll in Mono- und Dicotyledonen als verschieden betrachtet, ohne indessen Angaben über die Unterschiede zu machen, und er hat sogar seine Verschiedenheit „dans le même embranchement" betont.

A. Étard[2]) hat noch im Jahre 1906 in seinem Buche: „La biochimie et les chlorophylles" eine endlose Zahl von Chlorophyllen beschrieben und zwar nicht allein Pigmente ungleicher Herkunft; er stellte auch für eine einzige Pflanze, z. B. für Lolium perenne, eine ganze Reihe verschiedener Chlorophylle auf, deren Formeln

Loliophyll I: $C_{129}H_{214}NO_{14}$
II: $C_{22}H_{41}NO_5$
III: $C_{159}H_{257}NO_{21}$
IV: $C_{36}H_{155}NO_{14}$
V: $C_{52}H_{76}N_2O_9$
VI: $C_{34}H_{50}N_2O_{10}$

beispielslos differieren. Sie sind absurd; jede Fraktion von mehr oder weniger grün gefärbtem Wachs ist für ein individuelles Chlorophyll gehalten worden.

Die Identität des Chlorophylls beliebiger Herkunft ergibt sich:

aus der Bestimmung der basischen Spaltungsprodukte Phytochlorin und Phytorhodin,
aus der Bestimmung des Magnesiumgehaltes,
aus der Bestimmung des Phytolgehaltes.

Nachdem es gelungen war, Veränderungen des Farbstoffs bei seiner Isolierung aus den Pflanzen zu vermeiden, hat das Chlorophyll aller Pflanzen dieselben stickstoffhaltigen Derivate geliefert, deren Bestimmung das IV. Kapitel behandelt.

Es kommen also keine Variationen in der Zusammensetzung des Phytochromins vor.

Nun war es noch denkbar, daß außer dem Magnesium andere Elemente in der Rolle des komplex gebundenen Metalls auftreten

[1]) Compt. rend. 120, 355 [1895] und Bull. soc. chim [4] 5, 319 [1909].
[2]) Masson et Co., Paris.

könnten. Es hat deshalb nicht genügt, die metallfreien Abbauprodukte aus verschiedenen Pflanzen darzustellen und zu vergleichen, es war auch erforderlich, entweder Präparate von Chlorophyll selbst oder einem Chlorophyllide oder ebensogut Darstellungen eines krystallisierten Phyllins von möglichst verschiedenartiger Herkunft zu analysieren. Diese Untersuchung ist von Willstätter und Pfannenstiel[1]) ausgeführt worden, die das nämliche Rhodophyllin von der Formel $C_{33}H_{34}O_4N_4Mg$ mit einem Aschengehalt von 7% MgO aus Pflanzen der folgenden Gruppen gewonnen haben:

Kryptogamen: Chlorophyceae
Musci, Filicales, Equisetales;
Phanerogamen: Monocotylae; Gramineae;
Dicotylae; Urticaceae, Saxifraginae.

Später ist diese vergleichende Untersuchung des Magnesiumgehaltes noch weiter ausgedehnt und durch Isolierung von Chlorophyll oder seinen nächsten magnesiumhaltigen Derivaten aus einer größeren Anzahl von Pflanzen anderer Ordnungen ergänzt worden (z. B. aus Phäophyceen).

Der dritte Punkt, auf den sich unser Vergleich erstreckt, betrifft den stickstoffreien Alkohol, dessen Verbreitung in der Natur sich als außerordentlich erweist. Es wäre zu unsicher gewesen, von wenigen Beispielen den Satz abzuleiten, daß das Phytol ein Bestandteil des Chlorophylls aller Pflanzen ist und stets ein Drittel des Moleküls beträgt. Dieser Alkohol schien nicht in demselben Maße unersetzlich zu sein wie das Magnesium. Deshalb haben wir über 200 Pflanzenarten aus den verschiedenen Klassen herangezogen, um das Phytol durch Verseifung von Phäophytin zu isolieren und die Phytolzahl zu bestimmen[2]). Überdies ist das Phytol durch die Elementaranalyse von Präparaten aus 24 Pflanzenarten identifiziert worden.

Bei den ersten Versuchen wurde infolge der Chlorophyllasewirkung die Phytolzahl schwankend gefunden. Nachdem diese Fehlerquelle ermittelt war, gelang es, bei möglichst raschem Extrahieren der Blätter die Konstanz der Phytolzahl festzustellen.

[1]) Abh. V.
[2]) Ann. d. Chem. 378, 1 [1910].

Keine Ausnahme hinsichtlich des Phytolgehaltes ist beobachtet worden.

Die Beispiele waren so gewählt, daß Pflanzen von den verschiedensten Lebensbedingungen zur Beobachtung kamen: Meeresalgen, Süßwasserpflanzen und tropische Gewächse außer den einheimischen Landpflanzen.

Von Kryptogamen waren folgende Klassen (mit 12 Beispielen) vertreten:

Chlorophyceae, Charales, Phaeophyceae, Bryophyta, Pteridophyta (nämlich Filicales, Equisetales, Lycopodiales).

Dazu kamen Gymnospermae (2 Beispiele von Coniferae) und Monocotyledoneae (24 Beispiele) aus folgenden Familien:

Potamogetonaceae, Gramineae, Palmae, Araceae, Liliaceae, Musaceae.

Endlich von Dicotyledonen 164 Beispiele aus den Familien:

Salicaceae, Juglandaceae, Betulaceae, Fagaceae, Ulmaceae, Moraceae, Urticaceae, Aristolochiaceae, Polygonaceae, Chenopodiaceae, Ceratophyllaceae, Ranunculaceae, Magnoliaceae, Lauraceae, Papaveraceae, Cruciferae, Saxifragaceae, Platanaceae, Rosaceae, Leguminosae, Simarubaceae, Polygalaceae, Linaceae, Buxaceae, Celastraceae, Aceraceae, Hippocastanaceae, Balsaminaceae, Tiliaceae, Malvaceae, Bombacaceae, Dilleniaceae, Guttiferae, Dipterocarpaceae, Violaceae, Passifloraceae, Lecythidaceae, Oenotheraceae, Hallorrhagidaceae, Araliaceae, Umbelliferae, Cornaceae, Primulaceae, Oleaceae, Loganiaceae, Gentianaceae, Apocynaceae, Convolvulaceae, Borraginaceae, Verbenaceae, Labiatae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Bignoniaceae, Acanthaceae, Plantaginaceae, Rubiaceae, Caprifoliaceae, Valerianaceae, Dipsacaceae, Cucurbitaceae, Campanulaceae, Compositae.

VI. Isolierung der beiden Komponenten des Chlorophylls.

1. Zur Geschichte der Methode[1]).

Stokes.

G. G. Stokes hat entdeckt, daß das Chlorophyll aus zwei Komponenten besteht. Seine Angabe, die im Jahre 1864 in der inhaltsreichen Notiz[2]) „On the supposed Identity of Biliverdin with Chlorophyll, with remarks on the Constitution of Chlorophyll" erschienen ist, lautet:

„I find the Chlorophyll of land-plants to be a mixture of four substances, two green an two yellow, all possessing highly distinctive optical properties. The green substances yield solutions exhibiting a strong red fluorescence; the yellow substances do not. The four stubstances are soluble in the same solvents, and three of them are extremely easily decomposed by acids or even acid salts, such as bisoxalate of potash; but by proper treatment each may be obtained in a state of very approximate isolation, so far at least as coloured substances are concerned."

Die Untersuchung von Stokes bestand also in der spektroskopischen Unterscheidung der beiden Komponenten des Chlorophylls und der gelben Begleiter Carotin und Xanthophyll. Mit

---

[1]) Ann. d. Chem. 390, 275 [1912].

[2]) Proc. Roy. Soc. 13, 144 [1864]. Siehe auch Stokes' nachträgliche Fußnote im Neudruck der berühmten Abhandlung vom Jahre 1852: „On the Change of Refrangibility of Light", Mathematical and physical Papers, Vol. III, S. 300, Cambridge 1901.

welcher Methode der große Physiker das im Blätterextrakt enthaltene Gemisch von Pigmenten getrennt hat, verrät nur eine Bemerkung in dem Vortrag[1]) „On the Application of the optical Properties of Bodies to the Detection and Discrimination of organic Substances":

„For convenience and rapidity of manipulation, especially in the examination of very minute quantities, there is no method of separation equal to that of partition between solvents which separate after agitation. . . . . Bisulphide of carbon in conjunction with alcohol enabled the lecturer to disentangle the coloured substances which are mixed together in the green colouring-matter of leaves."

Stokes hat also zuerst die fruchtbare Methode der Entmischung angewandt, um das Chlorophyll von den gelben Pigmenten zu trennen und um es in seine Komponenten zu zerlegen. Leider ist weder die in Aussicht gestellte Abhandlung von Stokes über Chlorophyll erschienen, noch hat die Herausgabe seines wissenschaftlichen Nachlasses Aufzeichnungen darüber zutage gefördert.

Kraus und Sorby.

G. Kraus[2]) hat die in den Proc. of the Roy. Soc. veröffentlichten Resultate von Stokes gekannt, aber nicht dessen Methode, und er hat unabhängig von Stokes die Entmischung von alkoholischer Rohchlorophyllösung mit Benzol aufgefunden. Statt des Benzols hat etwas später R. Sachsse[3]) Benzin angewandt. Kraus hat mit der Entmischungsmethode nur die Trennung in grünes und gelbes Pigment erzielt, aber er hat die Methode nicht für die Auflösung des sogenannten Cyanophylls und Xanthophylls in je zwei Komponenten ausgebildet. Nur bei der Besprechung der kurz zuvor erschienenen Untersuchung von Sorby hat Kraus die Zusammensetzung des gelben und grünen Anteiles aus je zwei Komponenten berührt und er hat sie nicht bestätigen können.

---

[1]) Journ. chem. Soc. 17, 304, 311 [1864].

[2]) Zur Kenntnis der Chlorophyllfarbstoffe und ihrer Verwandten. Stuttgart 1872.

[3]) Die Chemie und Physiologie der Farbstoffe, Kohlehydrate und Proteinsubstanzen (Leipzig 1877), S. 23.

H. C. Sorby[1]) führt an, daß er durch einen Vortrag von Stokes in der Royal Institution zu seinen ausgedehnten spektroskopischen Untersuchungen angeregt worden sei[2]) und daß er durch unabhängige Versuche zu den gleichen Ergebnissen wie früher Stokes gelange; indessen ist es nicht wahrscheinlich, daß Sorby die Entmischungsmethode unbeeinflußt von Stokes Veröffentlichung aufgefunden hat. Sorby hat durch systematische Verteilung der Pigmente der Rohchlorophyllösung zwischen wasserhaltigem Alkohol und Schwefelkohlenstoff Entmischungen erzielt und zwar nur zu dem Zweck der spektroskopischen Unterscheidung und Beschreibung von Fraktionen, die übrigens noch nicht optisch einheitlich waren, ganz abgesehen von dem Gehalt der Lösungen an farblosen Begleitstoffen. Sorbys spektroskopische Angaben waren noch nicht genau und haben sich nur als teilweise richtig erwiesen.

Sorby unterscheidet neben den gelben Pigmenten drei verschiedene Chlorophyllfarbstoffe, die an den beiden Enden des Spektrums Absorption aufweisen und die rot fluorescieren: Blaues Chlorophyll, gelbes Chlorophyll und Chlorofucin.

Einen ganz anderen Sinn bekommt die Anwendung der Entmischung in der Arbeit von N. A. Monteverde[3]). Hier handelt es sich um die verschiedene Verteilung des amorphen und des krystallisierten Chlorophylls zwischen Alkohol und Petroläther. Die Beobachtungen Monteverdes sind erklärt durch die genauere Kenntnis des Borodinschen Chlorophylls. Das phytolhaltige Chlorophyll geht bei der Entmischung in die petrolätherische, das alkoholysierte, phytolfreie Chlorophyll in die alkoholische Schicht.

Auf einem neuen Wege hat W. H. Hartley[4]) eine Trennung von blauem und gelbem Chlorophyll zu erreichen geglaubt. Er läßt auf die alkoholische Rohchlorophyllösung eine warm gesättigte

[1]) On Comparative Vegetable Chromatology, Proc. Roy. Soc. 21, 442 [1873]; siehe auch Proc. Roy. Soc. 15, 433 [1867]; Quarterly Journ. of Microscopical Science 11, 215 [1871]; Quarterly Journ. of Science 8, 64 [1871].

[2]) Proc. Roy. Soc. 15, 433 [1867] und 21, 451 [1873].

[3]) Das Absorptionsspektrum des Chlorophylls, Acta Horti Petropolitani XIII, 123 [1893].

[4]) Journ. chem. Soc. 59, 106 [1891] und 85, 1607 [1904].

Bariumhydroxydlösung einwirken. Aus der gefällten Bariumverbindung setzt Borsäure in Glycerin Hartleys blaues Chlorophyll in Freiheit, während das Filtrat von der Bariumverbindung gelbes Chlorophyll enthält.

Wie schon früher nachgewiesen worden[1]), wird aber Chlorophyll von Bariumhydroxyd verseift, im Filtrat von Chlorophyllinbarium bleiben hauptsächlich gelbe Begleiter, vermischt mit etwas grünem Farbstoff, wenn die Verseifung nicht genügend energisch war.

Tswett.

M. Tswett[2]) hat die verdienstvollen Beobachtungen von Stokes gewürdigt und mit einer leistungsfähigen neuen Methode bestätigt. Das im Blattextrakt enthaltene Pigmentgemisch zerlegt Tswett mittels der chromatographischen Adsorptionsanalyse in seine sämtlichen Komponenten und untersucht sorgfältig ihre Spektra.

Das Prinzip der Methode besteht darin, daß Farbstoffe wie farblose Körper aus ihren Lösungen in organischen Flüssigkeiten durch pulverförmige Körper in verschiedenem Maße adsorbiert werden. Tswett verwendet für diese Zerlegung die Lösung des Rohchlorophylls in bestimmten Solvenzien, Petroläther, Benzol, Schwefelkohlenstoff, und filtriert sie durch eine Säule von Calciumcarbonat, Inulin oder Zucker. Dadurch werden die Farbstoffe niedergeschlagen und sie verdrängen sich dabei gegenseitig aus ihren Adsorptionsverbindungen nach der sinkenden Reihenfolge ihrer Wirkung auf die Oberflächenspannung des Lösungsmittels, so daß sich im entstehenden „Chromatogramm" eine Schichtung

[1]) Ann. d. Chem. 350, 63 [1906].

[2]) Physikalisch-chemische Studien über das Chlorophyll. Die Adsorptionen. Ber. d. d. bot. Ges. 24, 316 [1906]. Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls. Ebenda 24, 384 [1906]. Spektral-analytische Untersuchungen über die Chlorophylline und deren nächste Säurederivate (Chlorophyllane). Ebenda 25, 137 [1907]. — Über die Spektrophotometrie der Chlorophylline und die Energetik des Chlorophylls. Ebenda 25, 388 [1907]. — Siehe ferner Ber. d. d. chem. Ges. 41, 1352 [1908]; 43, 3199 [1910]; 44, 1124 [1911] und das russische Buch: Die Chromophylle in der Pflanzen- und Tierwelt, Warschau 1910 (bei Karbassnikow).

in so viele verschiedene farbige Zonen ergibt, als Komponenten im Farbstoffgemisch vorhanden sind. Die tingierte Säule läßt sich mit dem Skalpell methodisch zerlegen und jeder einzelne Farbstoff mit passenden Lösungsmitteln (Alkohol, Äther, Chloroform) wieder extrahieren.

Nach dieser Methode findet Tswett in dem Gemische fünf gelbe Farbstoffe, „Carotinoide", nämlich Carotin und vier Xanthophylle und zwei eigentliche Chlorophyllfarbstoffe, die er α- und β-Chlorophyllin nennt (entsprechend unserer Bezeichnung Chlorophyllkomponente a und b). Die Lösungen dieser Komponenten hat Tswett spektroskopisch beschrieben; seine Angaben sind, soweit sie die grünen Komponenten betreffen, in allem wesentlichen durch unsere Untersuchungen bestätigt worden.

Die chromatographische Methode ist bisher nur in sehr kleinem Maßstabe angewandt worden und sie erscheint für präparative Arbeit ungeeignet. Inwieweit es Tswett gelingt, bei der Bildung des Chromatogrammes und der Isolierung der Chlorophyllkomponenten aus demselben die Allomerisation des Chlorophylls zu verhüten[1]), ist noch nicht bekannt; nicht die spektroskopische Untersuchung, nur die Prüfung der Phytochlorine und Phytorhodine gibt darüber Aufschluß.

2. Verfahren von Willstätter und Isler[2]).

Die Beobachtungen von Stokes, von Sorby und Tswett über die Entmischung des Chlorophylls bestätigen sich im Wesentlichen; ein Teil dieser Angaben, nämlich die Beobachtungen über die Pigmente der Braunalgen wird durch unsere Nachprüfung (Kap. IV, V) korrigiert. Es ist bis jetzt unmöglich gewesen festzustellen, ob sich die Ergebnisse der Entmischung auf den natürlichen Farbstoff beziehen oder ob sie auf Veränderungen des Chlorophylls während der Extraktion und während der Entmischung beruhen. Gerade die Widerlegung der Angaben über die Phäophyceenfarbstoffe zeigt dies deutlich.

[1]) Zur Extraktion aus dem Chromatogramm dürfte nicht Alkohol angewandt werden; vgl. R. Willstätter und A. Stoll, Ann. d. Chem. 387, 357 [1912].

[2]) Abh. XX.

Der Nachweis von Veränderungen des Chlorophylls wird erst ermöglicht durch die Untersuchung der Spaltungsprodukte, der Phytochlorine und Phytorhodine, namentlich durch ihre Fraktionierung nach der Methode von Willstätter und Mieg. Hingegen ist die Untersuchung der Absorptionsspektra, in den Händen früherer Autoren die einzige Methode, ungeeignet, um erhebliche Veränderungen, wie die Allomerisation, zu erkennen.

Daher ist erst, nachdem die chemischen Merkmale des Chlorophylls, seine Beziehungen zu den Abbauprodukten, festgestellt waren, die Frage der Zusammensetzung des Chlorophylls aus zwei Komponenten zur Lösung reif geworden.

Bei der Reindarstellung des Chlorophylls nach Willstätter und Hug ist vom Anfang bis zum Ende die Frage außer Betracht geblieben, ob das Chlorophyll einheitlich oder ein Gemisch zweier Farbstoffe ist. Nachdem die Isolierung des grünen Pigmentes in der Zusammensetzung, wie es in der grünen Pflanze vorkommt, erzielt war, hat in der Fortsetzung dieser Untersuchung durch Willstätter und Isler die Methode der Verteilung des Chlorophylls zwischen mehreren miteinander nicht mischbaren Lösungsmitteln bestätigt, daß eine blaugrüne Komponente (a) und eine gelbgrüne (b) in den Extrakten wie in den Blättern existiert. Die systematische Fraktionierung nach der Entmischungsmethode hat zu dem Erfolg geführt, daß sich das Komponentenverhältnis mehr und mehr verschiebt und schließlich so weit, daß aus dem Gemisch die vollkommen einheitlichen Komponenten hervorgehen.

Die beiden Chlorophyllkomponenten sind gänzlich frei von farblosen und farbigen Begleitstoffen erhalten worden und, was viel schwerer zu erreichen war, auch frei von den spontan und außerordentlich leicht sich bildenden allomeren Verbindungen.

Bei der Isolierung des Chlorophylls nach Willstätter und Hug hat sich der Farbstoff des Extraktes in drei Fraktionen geteilt:

methylalkoholische Waschflüssigkeiten,
petrolätherische Restlösung und
methylalkoholische Hauptlösung.

Während die Hauptlösung keine beträchtliche Verschiebung im Komponentenverhältnis aufweist, finden wir

1. in der methylalkoholischen Waschflüssigkeit, namentlich in den allerersten Auszügen mit Holzgeist, die Komponente b stark überwiegend,
2. in der petrolätherischen Restlösung fast quantitativ Komponente a enthalten, nur verunreinigt von kleinen Mengen b.

Da die beiden Reinigungsoperationen im entgegengesetzten Sinne das Komponentenverhältnis verschieben, so ist es erklärlich, daß sich dieses ziemlich unverändert erhält, trotz der oft vorgenommenen Verteilung des Chlorophylls zwischen verschiedenen Lösungsmitteln.

Auf diese Beobachtung der Verteilung beider Komponenten zwischen Holzgeist und Petroläther gründet sich unser Verfahren für ihre vollständige Trennung: bei systematischer Fraktionierung des gemischten Chlorophylls zwischen wasserhaltigem Holzgeist und Petroläther läßt sich die Komponente b im Methylalkohol, a in der Benzinschicht anreichern und schließlich rein erhalten.

Diese Methode haben wir am einfachsten so gestaltet, daß die nach Willstätter und Hug bereitete petrolätherische Rohlösung des Chlorophylls mit 90prozentigem Holzgeist häufig, nämlich 14—16 oder sogar 20mal gewaschen wurde; dann war der Petroläther frei von der Komponente b. Das Chlorophyll in dieser Schicht hatte einen genügend hohen Reinheitsgrad erlangt, um durch vollständiges Herauswaschen des Methylalkohols ausgefällt zu werden. Von den methylalkoholischen Waschflüssigkeiten lohnt es sich, die sechs ersten auf die Komponente b zu verarbeiten; das sehr reichlich mit übergegangene Chlorophyll a läßt sich daraus, natürlich mit erheblichem Verlust an b, fast ganz beseitigen durch mindestens dreimaliges Waschen der holzgeistigen Lösung mit Petroläther. Dann wird auch die Komponente b nach dem Verdünnen mit Wasser in Petroläther übergeführt und nach dem Verfahren von Willstätter und Hug durch Herauswaschen des Methylalkohols aus der petrolätherischen Schicht ausgefällt.

Wenngleich dieses einfache Prinzip zur Trennung der zwei Komponenten verhilft, so genügt das Verfahren doch nicht für ihre Darstellung in ganz reinem Zustand.

Die Komponente b enthält hartnäckig Beimischungen von Xanthophyll, die sich z. B. bei der Spaltungsprobe verraten.

Die Komponente a ist zwar frei von b und von gelben Pigmenten, aber anscheinend nicht ganz rein von farblosen Begleitstoffen; sie scheidet sich unter diesen Umständen in so feinflockiger Form ab, daß es fast unmöglich ist (ohne Verdünnen mit Talk od. dgl.), sie zu filtrieren.

Bei dem häufigen Ausziehen der petrolätherischen Schicht mit 90prozentigem Holzgeist wird eben nicht der Reinheitsgrad des zurückbleibenden Chlorophylls immer weiter gesteigert, sondern man kommt, wie Willstätter und Hug gefunden haben, schon nach einigen Auszügen zu einem Punkt, wo das in den Methylalkohol übergehende Chlorophyll einen höheren Reinheitsgrad besitzt, als das im Petroläther zurückbleibende.

Deshalb ist es für die Reinigung von großem Vorteil, in den wasserhaltigen Holzgeist, also in das gleiche Lösungsmittel, mit dem man zuvor gewaschen hat, das Chlorophyll hineinzuführen und es daraus wieder in Petroläther zu bringen, ehe man die Abscheidung vornimmt.

Bei diesem Verfahren der Isolierung ist es aber ungünstig, daß bei der Abtrennung der Komponente b sehr viel a in hochprozentigem Zustand entfernt und verworfen worden ist. Der geschilderte Gang wird daher bedeutend dadurch verbessert, daß man die Trennung der beiden Komponenten erst in Angriff nimmt, wenn das Gemisch in seiner petrolätherischen Lösung mit 90prozentigem Holzgeist gewaschen und wenn es dann durch Hineinführen in 95prozentigen Holzgeist auf einen hohen Reinheitsgrad gebracht worden ist.

Diese Arbeitsweise bietet noch einen weiteren wichtigen Vorteil. Wäscht man die ursprüngliche petrolätherische Lösung einige Male mit 90prozentigem Holzgeist und verwirft man diese Auszüge, so ist das Xanthophyll damit quantitativ beseitigt und es läßt sich, wenn auch mit viel Verlust, die Komponente b in vollkommen reinem Zustande isolieren.

Das Verfahren ist in 74 Versuchen so ausgearbeitet worden, daß es in einem Arbeitstag (12 Stunden) mit einer Charge von

4 kg trockenen Blättern zu einer Ausbeute von 1—1,25 g Chlorophyll a und 0,1—0,4 g Chlorophyll b führt und noch die beiden Phäophytinkomponenten als Nebenprodukt ergibt.

3. Die Chlorophyllkomponenten nach Willstätter und Stoll[1]).

Mit der Methode von Willstätter und Isler hat unser neues Verfahren das Prinzip gemeinsam: Die Verteilung des Chlorophylls zwischen Methylalkohol und Petroläther, wobei die Komponente a die petrolätherische, b die methylalkoholische Phase vorzieht. Anstatt von den Extrakten auszugehen, legen wir das viel leichter zugänglich gemachte isolierte Chlorophyll der Fraktionierung als Ausgangsmaterial zugrunde. Dann können größere Mengen und konzentriertere Lösungen angewandt werden und das Verfahren läßt sich fast quantitativ gestalten.

Wenn aus der Petrolätherlösung von reinem Chlorophyll die Komponente b mit wässerigem Holzgeist ausgezogen wird, darf man eine gewisse Konzentration des Farbstoffs nicht überschreiten, um den in Petroläther bleibenden Anteil klar gelöst zu behalten. Die Anfangskonzentration darf 2 g Chlorophyll in 1 l Petroläther betragen. Nach Vorversuchen eignet sich für die Fraktionierung am besten 85prozentiger Methylalkohol; 80prozentiger nimmt zu wenig Farbstoff auf, in 90prozentigen würde schon zu viel von der Komponente a neben b übergehen.

Die Verteilung des Chlorophylls zwischen wasserhaltigem Methylalkohol und Petroläther unter den Bedingungen, welche praktisches Interesse bieten, haben wir mit den Methoden des Kap. IV in folgenden Versuchen näherungsweise bestimmt[2]).

1 g Chlorophyll vom Komponentenverhältnis 2,7 wird in 1 l Petroläther gelöst[3]) und mit dem halben Volumen 85-, später

[1]) Unveröffentlicht.

[2]) Für die Bestimmung führen wir die Auszüge in Äther über und verwenden einen aliquoten Teil, der verdampft und mit methylalkoholischer Kalilauge verseift wird.

[3]) Die Lösung wird durch Aufnehmen in 25 ccm Äther dargestellt, der nach Vermischen mit Petroläther durch 50prozentigen Holzgeist weggewaschen wird.

90 prozentigem Holzgeist extrahiert, der zuvor mit Petroläther gesättigt worden.

Lösungsmittel	Auszug	Proz. von angew. Komp. a	Proz. von angew. Komp. b	Komponentenverhältnis
85 proz. CH_3OH	1 + 2	3,4[1])	16,1	0,56
„	3 + 4	2,9	14,8	0,52
„	5 + 6	2,8	13,2	0,58
„	7 + 8	2,8	11,4	0,72
„	9 + 10	3,0	9,6	0,84
„	11 + 12	3,0	7,8	1,02
„	13 + 14	2,8	6,3	1,19
„	15 + 16	2,7	5,0	1,44
90 proz. CH_3OH	17 + 18	6,8	8,0	2,23
„	19 + 20	5,7	4,0	3,81

Es ergibt sich, daß aus dem Petroläther (0,64—0,66) in das gleiche Volumen Holzgeist folgende Anteile übergehen:

von a in 85 prozentigen CH_3OH 3, in 90 prozentigen 8—9%,

von b in 85 prozentigen CH_3OH 17—18, in 90 prozentigen ca. 60%;

Teilungsverhältnis für Petroläther und 85 prozentigen CH_3OH: a 32, b $4^1/_2$,

Teilungsverhältnis für Petroläther und 90 prozentigen CH_3OH: a 11, b $^1/_3$.

Man kann aus diesen Bestimmungen folgern, daß für die Isolierung des Chlorophylls b nur die Auszüge mit einem Komponentenverhältnis von weniger als 1 bis zu 1 geeignet sind und daß es, um die methylalkoholischen Lösungen der Komponente b durch Waschen mit Petroläther von a zu befreien, zweckmäßig ist, die Methylalkoholkonzentration zu steigern, z. B. auf 90, aber nicht höher, und in Anbetracht der sehr differierenden Teilungsverhältnisse mit wenig Petroläther zu waschen.

Verfahren.

8 g Chlorophyll lösen wir in 150—200 ccm Äther und gießen die undurchsichtige Flüssigkeit, um sicher zu sein, daß sie keinen

[1]) Diese Zahl ist infolge der Beimischung von etwas Äther zu hoch,

ungelösten Anteil enthält, durch ein Filter in einen mit 4 l Petroläther (0,64—0,66) beschickten 7 l-Scheidetrichter. Dabei beginnt gewöhnlich das Chlorophyll wieder auszufallen und es bedarf eines Zusatzes von 50—100 ccm Methylalkohol zur Klärung.

Der Äther muß vor der Fraktionierung durch Waschen mit 80prozentigem Holzgeist beseitigt werden, mit 2 l in 1—2 Auszügen, auf deren Verarbeitung wir verzichten. Mit diesen oder noch etwas mehr Auszügen lassen sich, wenn man Rohchlorophyll für die Isolierung der reinen Komponenten verarbeitet, zugleich die gelben Pigmente und farblosen Beimischungen beseitigen.

Vor dem Versuche sind der 85- und 90prozentige Methylalkohol mit Petroläther, wovon sie 5,5 und 10% aufnehmen, gesättigt und unmittelbar vor dem Gebrauch mit 0,01 g Oxalsäure pro Liter angesäuert worden.

Durch ungefähr 14 Auszüge mit je 2 l 85prozentigem Methylalkohol wird die Komponente b genügend extrahiert; das Chlorophyll dieser Auszüge wird nur auf die Komponente b, das im Petroläther zurückbleibende nur auf a verarbeitet.

Der erste Auszug wird nach der Abtrennung von der Petrolätherlösung durch Zusatz von 1 l Methylalkohol auf eine Konzentration von 90% gebracht, nun mit 1 l Petroläther gründlich gewaschen, sogleich in 2 l Äther eingetragen und mit viel Wasser entmischt.

Den zweiten Auszug vermischen wir gleichfalls mit 1 l Methylalkohol und schütteln ihn mit dem Waschpetroläther des ersten Auszugs unter Zusatz von einem weiteren $^1/_2$ l Petroläther durch. Dann wird die gereinigte b-Lösung in den ersten Ätherextrakt, dem noch 1 l Äther zugefügt wird, übergeführt. Diese großen Äthermengen sind erforderlich, weil der wässerige Holzgeist viel Äther fortnimmt und der beim Verdünnen ausgeschiedene Petroläther die Überführung aus Holzgeist in Äther erschwert. Jeder Waschpetroläther wird in einem Scheidetrichter mittels durchströmenden Wassers von Holzgeist rasch befreit, worauf der Farbstoff fein ausfällt.

Die Auszüge 3 und 4 werden ebenso gereinigt und verarbeitet; der Gehalt an b geht darin erheblich zurück.

Bei den üblichen Gemischen mit dem Komponentenverhältnis 2,5—2,8 setzen wir dem sechsten methylalkoholischen Auszug vor dem Waschen mit Petroläther nur 900 ccm Holzgeist hinzu, dem siebenten 800, dem achten 700 und endlich dem vierzehnten nur noch 100 ccm.

Man reinigt sie paarweise mit demselben Liter Petroläther, der bei seiner zweiten Verwendung noch mit $^1/_2$ l ergänzt wird und führt sämtliche Auszüge in dieselbe Ätherlösung über und zwar stets unter Zusatz von weiteren Äthermengen, anfangs von je 1 l, etwa vom zehnten Auszug an von je $^1/_2$ l.

Bei b-reichem Ausgangsmaterial wird noch der sechste oder siebente Auszug auf 90% Methylalkoholkonzentration gebracht und erst bei den späteren Ausschüttelungen der Zusatz von Holzgeist um je 100 ccm vermindert.

Der fünfzehnte und sechzehnte Auszug hat nur noch den Zweck, das Chlorophyll a von den letzten Anteilen der Komponente b zu befreien; diese Reinigung der Petrolätherschicht führen wir zu Ende, indem wir sie noch dreimal mit je 2 l 90prozentigem Holzgeist ausschütteln. Aus den methylalkoholischen Waschflüssigkeiten führt man den Farbstoff in Petroläther über, er ist reich an a und wird als Nebenprodukt isoliert, ebenso wie das an b relativ reiche Chlorophyll der früheren Waschpetroläther.

Die nach dem Abtrennen von b grünblaue Lösung der Komponente a waschen wir mit Wasser, bis das Chlorophyll quantitativ ausgefallen ist und nehmen dieses je nach seiner Beschaffenheit mit 30—100 g Talk auf, um es auf der Nutsche durch eine Schicht von Talk unter schwachem Saugen zu filtrieren. Der Petroläther läuft dabei farblos ab. Die Talkschicht wird mit niedrig siedendem Petroläther nachgewaschen und bis zum Verschwinden des Petroläthergeruches abgesaugt. Dann zieht man den Farbstoff aus dem Talk durch Anschütteln in der Flasche mit möglichst wenig reinem Äther aus und filtriert die schön tiefblaue Lösung auf einer kleinen Nutsche ab. Das Filtrat ist durch wiederholtes Filtrieren von den mitgerissenen Talkpartikeln zu befreien. Endlich verdampfen wir den Äther beinahe ganz, spülen die konzentrierte Lösung in eine Schale und lassen den Äther im Vakuumexsiccator vollständig eintrocknen.

Das Chlorophyll a hinterbleibt als prächtig blauschwarz glänzende blätterige Masse. Die reingelbe Phase mit methylalkoholischer Kalilauge, das Fehlen gelber Pigmente, die quantitative Bildung von Chlorin e bei der Spaltung (nur bei sehr großen Proben läßt sich Phytorhodin neben Chlorin g nachweisen, beide in Spuren) und die Indifferenz gegen 23prozentige Salzsäure bestätigen die Reinheit der Präparate.

Die Komponente b, ausgeäthert aus den mit Petroläther gewaschenen methylalkoholischen Auszügen, befindet sich in Äther-Petrolätherlösung. Wir befreien dieselbe durch Waschen mit Wasser vom Holzgeist und dampfen nach dem Trocknen mit Natriumsulfat auf ungefähr $^1/_2$ l ein. Dabei steigt der Siedepunkt infolge der Anreicherung der schwerer flüchtigen Kohlenwasserstoffe auf 50—60°; deshalb dampfen wir weiter unter vermindertem Druck bei 40—50° bis auf etwa 30 oder 40 ccm ein und fällen dann die Hauptmenge des Chlorophylls b mit 300 ccm Petroläther vom Siedepunkt 30—50°. Die Fällung wird sofort auf wenig Talk abfiltriert; die Mutterlauge enthält, wie die braune Phase erkennen läßt, vorwiegend a. Auch das ausgeschiedene Chlorophyll weist noch etwas von der Komponente a auf und muß deshalb noch einmal, beim Verarbeiten a-reichen Ausgangsmaterials sogar zwei- bis dreimal, aus Äther mit Petroläther umgefällt werden, wobei jedesmal etwas von leicht löslichem a im Filtrat bleibt. Die Fällung wird daher mit leicht flüchtigem Petroläther nachgewaschen, trocken gesaugt und wieder mit Äther extrahiert, der auf 10 ccm eingedampft und mit 400—500 ccm Petroläther gefällt wird.

Es ist eine Eigentümlichkeit der Komponente b, daß sie sich in viel besser filtrierbarer Form abscheidet als a; die ausgefällten Körnchen setzen sich rasch ab, man kann davon dekantieren und sie auf Hartfilter absaugen. Nach dem Trocknen im Exsiccator bildet das Chlorophyll b eine spröde grünschwarze Masse. Nach der Prüfung der Phase (dunkelrot), der Spaltung (nur Rhodin g) und der Basizität (23prozentige Salzsäure wird nicht angefärbt) waren unsere Präparate unversehrt und frei von der andern Komponente.

Die Ausbeute (aus 8 g vom Komponentenverhältnis 2,8) betrug z. B. 3,7 g Chlorophyll a und 1,15 g b, während 2,3 g Chlorophyllgemisch als Nebenprodukt zurückgewonnen wurde. Ein anderes, aus frischen Blättern gewonnenes Ausgangspräparat lieferte beispielsweise, gleichfalls aus 8 g, 4,0 g Komponente a, 1,2 g b und 1,5 g zurückgewonnenes Gemisch.

4. Beschreibung der Chlorophyllkomponenten[1]).

Chlorophyll a und b sind, aus Äther mit Petroläther ausgefällt, mikrokrystallinisch. Beim langsamen Eindunsten von Lösungen in Äther-Petroläthergemisch krystallisiert namentlich die Komponente a in charakteristischen Formen, in Drusen von dünnen lanzettförmigen Blättchen. Das Chlorophyll a bildet ein blauschwarzes, leicht verreibliches Pulver, das grünen Strich gibt und beim Reiben auf glatter Fläche stahlblauen Glanz annimmt, das Pulver von b ist dunkelgrün bis grünschwarz.

Im Schmelzpunktsrohr sintert a und fließt zwischen 117—120° zu einer zähen Masse zusammen, b sintert zwischen 86 und 92°, es wird bei 120—130° zähflüssig und beginnt dann sich aufzublähen.

Die Chlorophyllkomponente a ist in Äther und absolutem Alkohol spielend leicht löslich, in Methylalkohol in der Kälte nur mäßig, warm ziemlich leicht. In 95prozentigem Äthylalkohol ist sie noch sehr leicht, in 80prozentigem schwer, in 90prozentigem Holzgeist auch in der Wärme schwer und in 80prozentigem beinahe nicht löslich. In Aceton, Chloroform und Schwefelkohlenstoff ist Chlorophyll a spielend, auch in Benzol sehr leicht löslich. Nur in Petroläther löst sich die Substanz sehr schwer, selbst in der Wärme; Ligroin (Kahlbaum) löst etwas mehr, in der Wärme sogar ziemlich leicht und die Lösung wird durch Petroläther gefällt. Ein sehr geringer Zusatz von Alkoholen zum Petroläther erhöht die Löslichkeit des Chlorophylls außerordentlich.

Die äthylalkoholische Lösung ist blaugrün, tiefrot fluorescierend; in dicker Schicht läßt sie rubinrotes Licht hindurch. Geradezu blau kann man die konzentrierte ätherische Lösung nennen,

[1]) Ann. d. Chem. 390, 327 [1912].

beim Verdünnen wird sie mehr grünstichig. Die alkoholische Lösung wird beim Vermischen mit Petroläther blaustichiger, aber nicht in gleichem Maße wie mit Äther. Auffallend gelbstichig ist die Farbe in Schwefelkohlenstoff.

Bei raschem Verdünnen einer konzentrierten Lösung von Chlorophyll a in Alkohol oder Aceton mit viel Wasser entsteht eine wochenlang haltbare kolloidale Lösung; sie ist in der Durchsicht reingrün und fluoresciert nicht, aber sie zeigt eine sehr schöne blaugrüne Opalescenz; sie gibt den Farbstoff erst bei anhaltendem kräftigen Durchschütteln an Äther ab, wobei die wässerige Schicht zuerst blaugrün wird, sofort bei Zusatz von etwas Chlorcalcium.

Die Löslichkeit des Chlorophylls b ist im allgemeinen eine etwas geringere als die von a, aber der Unterschied ist nur in Petroläther sehr deutlich. Die Komponente b ist nämlich darin in der Kälte ganz unlöslich, und das Lösungsmittel wird auch beim Kochen kaum angefärbt; Ligroin (auch mit Salpeterschwefelsäure gereinigtes) löst die Substanz mäßig. Die Farbe in verschiedenen Lösungsmitteln differiert lange nicht so sehr wie bei a, die ätherische Lösung ist leuchtend grün, die alkoholische etwas dumpfer grün, nur im Vergleich mit den Lösungen von a erscheinen die von b stark gelbstichig. Allein die Schwefelkohlenstofflösung ist entschieden gelbgrün. In der Durchsicht sind die Lösungen in dicker Schicht nicht rein rot, sondern mehr grünlich braunrot; die Fluorescenz der Komponente b ist braunstichig rot.

Die kolloidale Lösung ist in der Durchsicht gelbgrün und opalisiert dunkelolivgrün.

In absolutem Alkohol und in Äther ist Chlorophyll b sehr leicht, in Methylalkohol in der Kälte ziemlich schwer, in der Wärme ziemlich leicht löslich; 90prozentiger Äthylalkohol löst schon schwerer, 80prozentiger sehr schwer, ebenso 90prozentiger Holzgeist. In Chloroform, Schwefelkohlenstoff und Aceton ist die Substanz sehr leicht, in Benzol leicht löslich, spielend in Pyridin. Im Sonnenlicht wird die benzolische Lösung zuerst prächtig rot, ehe sie allmählich ausbleicht.

Die Chlorophyllkomponente a wird in ätherischer Lösung beim Schütteln mit 6prozentiger Salzsäure allmählich, mit 20prozentiger

augenblicklich zersetzt; bei der Komponente b erfolgt die Spaltung etwas schwieriger. Mit überschüssiger ätherischer Chlorwasserstoffsäure tritt sofort die schön blaue, bei b die grüne Farbe eines Phäophytinchlorhydrates auf.

Bei der Phasenprobe schlägt die Farbe der Komponente a in reines Gelb um. Da die Phase bei der Phytylverbindung etwas rascher als bei dem Methylderivat vorübergeht, führen wir hier die Probe meistens so aus, daß die ätherische Lösung des Chlorophylls mit dem methylalkoholischen Kali vorsichtig unterschichtet wird. Dann tritt an der Trennungsschicht eine Zone in der charakteristischen Farbe auf, die sich beim Umschütteln einen Augenblick der ganzen Flüssigkeit mitteilt. Wird nach der Rückkehr der Chlorophyllfarbe Wasser hinzugefügt, so bleibt der Äther farblos.

Das Chlorophyll b zeigt eine leuchtendrote Phase, dann kehrt in einigen Minuten, also viel langsamer wie bei a, über eine braune Mischfarbe die ursprüngliche Farbe zurück.

Dem Spektrum der roten Phase von Chlorophyll b fehlt die sonst für alle bisher untersuchten Chlorophyllderivate charakteristische Hauptabsorption im Rot oder Orange. Bei mäßiger Schichtdicke sind anfangs einzelne Bänder nicht zu erkennen, bis sich dann in wenigen Sekunden die sehr weit gegen das rote Ende, bis zum Gelb, hinreichende Endabsorption des stärker gebrochenen Teiles in 2 starke Bänder im Grün bei $\lambda = 530$ und 495 $\mu\mu$ auflöst. Ganz allmählich erst tritt im Rot ein Band bei $\lambda = 650$ auf, das im Laufe einiger Minuten sehr dunkel und breit wird; die Bänder im Grünen treten immer mehr zurück und es wird im Gelb bei 575 ein neues Band sichtbar. Endlich nach etwa 10 Minuten ist die rein grüne Farbe der alkalischen Lösung mit dem der Komponente b eigentümlichen Spektrum wieder zurückgekehrt.

Die gelbe Phase von Chlorophyll a zeigt im Spektroskop einen ähnlichen Verlauf, nur sind die einzelnen Stufen infolge der kurzen Dauer von wenigen Sekunden bis zur Rückkehr der grünen Farbe spektroskopisch schwerer zu beobachten.

Die Analysen der im Hochvakuum getrockneten Präparate beider Komponenten werden durch Formeln interpretiert, die namentlich von der Zusammensetzung der einfacheren und daher

analytisch ausschlaggebenden Chlorophyllide und Phäophorbide hergeleitet sind, nämlich:

für Chlorophyll a: $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg + {}^1/_2 H_2O$ (Halbhydrat),

für Chlorophyll b: $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$.

Die Zusammensetzung nicht allein der Komponente a, sondern einer ganzen Anzahl von Chlorophylliden und Alphylphäophorbiden wird durch Formeln mit $5^1/_2$ und $6^1/_2$ Atomen Sauerstoff ausgedrückt. Diese Formeln sind nicht zu verdoppeln; solche Verbindungen sind vielmehr als Halbhydrate zu erklären und ihre Molekulargewichte stehen mit den einfachen Formeln im Einklang.

Nach der kryoskopischen Methode in Veratrollösung ergibt z. B. Äthylchlorophyllid (mit gebundenem Äther) das Molekulargewicht 738 anstatt 693, nach der ebullioskopischen Methode in Chloroform ergibt Äthylphäophorbid 639 statt 629 und Phäophytin 839 statt 880. Auch zeigt die Analyse der magnesiumfreien Derivate Phäophorbid a und b, daß $^1/_2$ Molekül Wasser keine Funktion hat und daß es sich nicht um äußere Anhydridbildung handelt.

Die Absorptionsspektra[1]).

Die Zeichnungen der Tafel VI (Kap. XXV) stellen die Absorptionsspektra der Methylverbindungen dar, diejenigen der Chlorophyllkomponenten sind in den photographischen Aufnahmen der Tafel VIII wiedergegeben.

Während die zeichnerische Darstellung vier Abstufungen benützt, führen wir die Messung mit folgenden sechs Zeichen für den Grad der Absorption an:

— dunkel, —— ziemlich dunkel, ... mäßige Absorption, .. schwache Absorption, . sehr wenig geschwächt, | schwacher Schatten.

Chlorophyllkomponente a. Das Spektrum zeigt in der sichtbaren Region sieben scharf getrennte Absorptionsbänder und die Endabsorption (VIII) mit der Reihenfolge nach der Intensität: VIII, VII, I, VI, II, III, IV, V.

Das IV. Band steht bei brauchbaren Chlorophyllpräparaten an Intensität weit hinter dem dritten zurück, ein kräftigeres

[1]) Abh. XVII.

Hervortreten von IV deutet auf beginnende Phäophorbidbildung hin.

Am stärksten tritt also je ein Band in der roten, indigblauen und violetten Region hervor; die schwächsten Absorptionsstreifen liegen im Gelb und Grün.

Die Methyl- und Äthylchlorophyllide stimmen hinsichtlich des Ortes und der Intensität der Bänder überein mit dem Phytylpräparat, nur scheinen die Begrenzungen der Bänder bei den einfachen Chlorophylliden etwas schärfer zu sein.

Unsere Beobachtungen stimmen mit den Angaben, die M. Tswett über seine durch chromatographische Adsorptionsanalyse in kleinem Maßstab getrennten Präparate der Chlorophyllkomponenten macht, im Wesentlichen überein, nur fehlt in der Beschreibung von Tswett das VI. Band oder vielmehr es findet sich nur bei seinen größten Schichten als Schatten vor der Endabsorption.

Lösung von 0,0431 g in 1 l Äther ($^1/_{1000}$ Mol. in 20 l.)

Schicht in mm	2,5	10	40	80
Band I	669 — — 655	675 — 648	680—637.625	684—596.587
„ II	619 | 605	623..603	625— —600	
„ III	—	585.570	586...564	587—561
„ IV	—	—	539..523	541...521
„ V	—	—	504 | 489	504.488
„ VI	462 | 455	465.453		
„ VII	439—427		471.	
Endabsorption (VIII)	...415—	444—	468—	473—

Chlorophyllkomponente b. Das Spektrum besteht aus neun Bändern zwischen $\lambda = 700$ und 410 $\mu\mu$, dazu kommt die vor $\lambda = 400$ beginnende Endabsorption (X); in bezug auf ihre Intensität stehen die Bänder in der Reihenfolge: VIII, II, IX, X, I, IV, III, VI, V, VII.

Das Band des Chlorophylls a im Rot[1]) ist bei der Komponente b in zwei Bänder geteilt, desgleichen die Absorption im Orange; dem Absorptionsstreifen von a im Gelb entspricht hier ein schmaler

[1]) Ein schwacher Schatten im äußeren Rot, der früher manchmal beobachtet worden, fehlt bei den besten Präparaten der Komponente b.

und schwächerer Streifen im Grün, hingegen ist die Absorption im Blau (VI von a, VIII bei b) außerordentlich intensiv geworden und nun das stärkste Band. Bei dicker Schicht zeigt die Lösung zwei sehr charakteristische Transmissionsbänder, das eine im Rot bei B, das andere im Grün von der Linie E an.

In Tswetts Beschreibung dieses Spektrums fehlt das erste Band im Rot sowie das Band im Grün.

Lösung von 0,0431 g in 1 l Äther ($^1/_{1000}$ Mol in 20 l)[1]).

Schicht in mm	2,5	10	40	80
Band I	666.659	667...659.651	673—625	677—582..
„ II	648...638	651—635		
„ III	—	615 | 611	615.609	574...559
„ IV	—	599.585	600...583	—
„ V	—	—	571.559	—
„ VI	—	—	547..530	549...530
„ VII	—	—	506 | 500	
„ VIII	467—446			
„ IX	433..424	474—	483—	508.489—
Endabsorption (X)	407—			

Die kolloidale Lösung des Chlorophylls weist gegenüber einer wahren Lösung ähnlich wie das lebende Blatt alle Bänder weit gegen Rot hin verschoben auf (siehe auch Kapitel III, Abschnitt 2a). Bei der Beobachtung mit einer Nernstlampe als Lichtquelle wurden die nachfolgenden Werte für Chlorophyll a gefunden.

0,044 g in 1 l Wasser, 1% Aceton enthaltend ($^1/_{1000}$ Mol in 20 l).

Schicht in mm	10	20	40
Band I	692—664	712—658	732—650..
„ II	—	637 | 615	640...609
„ III	—	595 | 581	598..575
„ IV	—	—	554.534
„ V	—	—	510.490...
„ VI	466...455—	471—	477—
Endabsorption			

Aus der 10 mm Schicht berechnet sich für die Achse der Hauptabsorption im Rot $\lambda = 678$ gegenüber $\lambda = 662$ für das erste Band des Spektrums der ätherischen Lösung von Chlorophyll a.

[1]) Messung mit dem Präparat unseres neuen Verfahrens.

VII. Die Wirkungen der Chlorophyllase[1]).

1. Definition.

Während die Isolierung des Chlorophylls und die Trennung in seine beiden Komponenten ohne chemische Reaktion, nämlich nur durch vorsichtige Anwendung von Lösungsmitteln erfolgt, sind die krystallisierenden Alphylchlorophyllide und freien Chlorophyllide sowie ihre magnesiumfreien Verbindungen durch Umwandlung mittels einer Esterase von spezifischer Wirkung gewonnen worden, welche das Chlorophyll in den grünen Blättern begleitet und infolge ihrer Unlöslichkeit nicht in die Extrakte übergeht. Das Enzym wird als Chlorophyllase bezeichnet.

Die Anwendung des Enzyms zu präparativen Zwecken, die in den folgenden Kapiteln behandelt wird, setzt die Methode für seinen Nachweis voraus und die Ergebnisse über seine Verbreitung sowie die quantitative Bestimmung seiner Wirkung.

Wir sind auf das Enzym aufmerksam geworden durch die Beobachtung[2]), daß der Phytolgehalt des Chlorophylls bei längerer Berührung mancher Blätterextrakte mit der Blattsubstanz allmählich von der normalen Prozentzahl 33 bis fast auf Null sinkt, während beim Stehen filtrierter Chlorophyllösungen keine Änderung des Farbstoffs erfolgt.

Galeopsis tetrahit gab bei raschem Extrahieren des Blattmehls die Phytolzahl 31,3. Derselbe Extrakt führte nach 10tägigem Stehen zu der Phytolzahl 30,9. Der Extrakt mit dem zugehörigen extrahierten Galeopsismehl 3 Tage unter zeitweisem Schütteln angesetzt, liefert Phäophorbid mit 2,7% Phytol.

---

[1]) Abh. XI, XIII, XIX.
[2]) Ann. d. Chem. 378, 4 [1910].

Die Reaktionen, welche unter dem Einfluß des Enzyms in alkoholischen Chlorophyllösungen eintreten, bestehen in Umesterungen, nämlich im Ersatz des Phytolrestes durch die Methyl- oder Äthylgruppe; dies ist also eine Alkoholyse des Chlorophylls, Äthanolyse und Methanolyse, z. B. in der a-Reihe:

1) $[C_{32}H_{30}ON_4Mg](CO_2CH_3)(CO_2C_{20}H_{39}) + CH_3OH = C_{20}H_{39}OH + [C_{32}H_{30}ON_4Mg](CO_2CH_3)_2$,

2) $[C_{32}H_{30}ON_4Mg](CO_2CH_3)(CO_2C_{20}H_{39}) + C_2H_5OH = C_{20}H_{39}OH + [C_{32}H_{30}ON_4Mg](CO_2CH_3)(CO_2C_2H_5)$.

Ferner wird in anderen wasserhaltigen Lösungen, z. B. Äther und namentlich in verdünntem Aceton, die Phytolestergruppe zu freiem Carboxyl hydrolysiert nach der Gleichung:

3) $[C_{32}H_{30}ON_4Mg](CO_2CH_3)(CO_2C_{20}H_{39}) + H_2O = C_{20}H_{39}OH + [C_{32}H_{30}ON_4Mg)(CO_2CH_3)(COOH)$.

Diese Reaktionen werden quantitativ verfolgt mittels der Phytolzahl von Phäophytin. Bei der Äthanolyse finden wir in jeder Phase der Reaktion den eingetretenen Äthylalkohol dem abgespaltenen Phytol äquivalent. Daher kann man auch aus dem Anwachsen des leichtflüchtigen Alphyls den Gang der Reaktion ableiten.

Daß die Veränderungen des Chlorophylls wirklich durch das Enzym verursacht werden, zeigt sich beim Vergleich frischer und abgebrühter Blätter. Die Chlorophyllase ist zwar besonders widerstandsfähig, wie ihre Anwendung in hochprozentiger Alkohol- und Acetonlösung zeigt, und sie hält sich sogar einige Zeit beim Kochen mit Alkohol, aber durch kurzes Sieden der Blätter mit Wasser wird sie zerstört. Die Umwandlung des Chlorophylls bei der Berührung seiner Lösungen mit Blattsubstanz bleibt dann aus.

5 g frische Heracleumblätter wurden mit etwas Quarzsand fein zerrieben und mit 8 ccm Aceton eine Stunde lang geschüttelt. 95% des Chlorophylls sind hydrolysiert worden.

Der Versuch wurde wiederholt, nachdem wir die Blätter 5 Minuten gekocht hatten. Zwischen Filtrierpapier abgedrückt wogen sie noch 4 g. Wir behandelten sie mit 1 ccm Wasser und 8 ccm

Aceton wie zuvor und konnten diesmal keine Spur von Hydrolyse nachweisen.

2. Nachweis der Chlorophyllase.

Die an Chlorophyllase reichen Pflanzen entfalten ausgezeichnet die Wirkung des Enzyms, wenn man ihre frischen Blätter in wasserhaltigen Methylalkohol einlegt, z. B. 2 g Heracleumblatt in 5 ccm 70prozentigen Holzgeist. Dann färbt sich das Blatt zuerst tiefer grün an, wird bald heller, zunächst abseits der Blattnerven, und schließlich gelb. Zugleich tritt ein Teil des Chlorophylls aus den Blättern aus, das Lösungsmittel färbt sich hellgrün an. Das herausgelöste Chlorophyll ist nach seinen Löslichkeitsverhältnissen gänzlich methanolysiert; es ist in alkoholhaltigem Petroläther unlöslich. In einigen Stunden wird der Extrakt schwach grünlichgelb, er enthält jetzt kein gelöstes Chlorophyll mehr, sondern bildet eine Suspension schöner mikroskopischer Krystalle des Methylchlorophyllides. Die Hauptmenge des Chlorophylls ist aber im Blatte gleichfalls in Form mikroskopischer Krystalle ausgeschieden.

Die Untersuchung mikroskopischer Schnitte der mit Methylalkohol behandelten ganzen Blätter gibt ein genaueres Bild von der Umwandlung des Chlorophylls[1]). Nach dem Einlegen der Blätter in Holzgeist nehmen die Chloroplasten ein dunkleres Aussehen an, dann tritt aus ihnen das Chlorophyll heraus und färbt zunächst die ganze Zelle intensiv grün an. Am dunkelsten erscheinen die Pallisadenzellen, heller grün das Schwammparenchym infolge seines geringen Chlorophyllgehaltes. Die Epidermis bleibt farblos. Am Ende des Vorgangs, nach dem Vergilben, erkennt man mit unbewaffnetem Auge, wenn man ein Blatt gegen das Licht hält, darin eine Schar schwarzer Punkte. Im mikroskopischen Schnitt findet man jetzt das Chlorophyll in einzelnen Zellen zu größeren Krystalldrusen angehäuft, die sich aus vielen gut ausgebildeten rhombenförmigen Täfelchen zusammensetzen (Fig. 6).

Zum größten Teil befindet sich das Chlorophyllid in dieser Form innerhalb des Blattgewebes, nur wenige einzelne Krystalle liegen außerhalb desselben.

---

[1]) Ann. d. Chem. 387, 336 [1911].

Wenn man statt der ganzen Blätter die mikroskopischen Schnitte der frischen Blätter mit Alkohol behandelt, wie es zuerst J. Borodin[1]) beschrieben hat, so verläßt bei der Alkoholyse viel Chlorophyll die Zellen und das Chlorophyllid befindet sich am Ende zum großen Teil außerhalb des Blattgewebes. Unter diesen Bedingungen bildet es schöne einzelne Krystalle, und zwar die Methylverbindung wieder rhombenförmige Blättchen, das Äthylderivat sehr charakteristische drei- und sechseckige Täfelchen (Fig. 7). In der Figur sind nur die innerhalb der Zellen liegenden Krystalle mit schwarzen Flächen dargestellt.

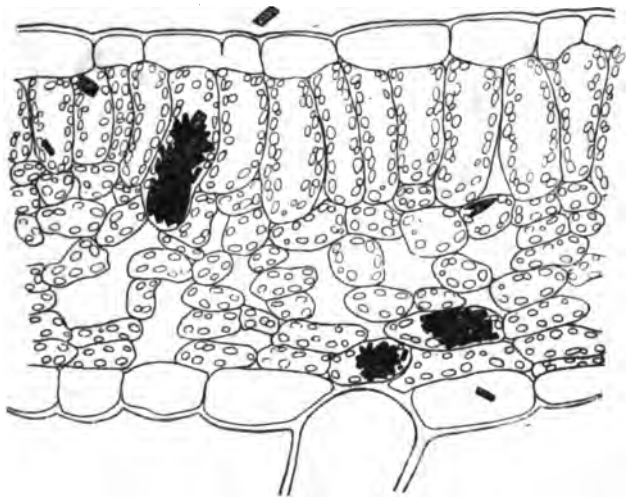


Fig. 6. Schnitt nach der Methanolyse mit ganzem Blatt von Heracleum.

Werden die Blätter chlorophyllasearmer Pflanzen mit den Alkoholen behandelt, so verläßt das Chlorophyll die Chloroplasten gleichfalls, aber langsamer, und es scheidet sich in einzelnen unscharf begrenzten Klumpen im Blattgewebe aus.

Die Auflösung des Chlorophylls in den verschiedenen Fällen und seine Wiederabscheidung erklärt sich durch die lösende Wirkung der mit Alkohol sich vermischenden lipoiden Chloroplastenbestandteile. Wenn sich die entstandene Lösung mit dem wasserhaltigen Alkohol weiter verdünnt, so wird sie übersättigt an Chloro-

[1]) Botan. Zeitung 40, 608 [1882].

phyll oder Chlorophyllid. Rasch erfolgt dann die Ausscheidung, wenn das Chlorophyll durch die Alkoholyse krystalloid geworden ist.

Auf einen Gehalt an Chlorophyllase kann man auch kleine Mengen von Mehl getrockneter Blätter prüfen, indem man durch Ansetzen von $^1/_2$ g mit 2 ccm 85 prozentigem Äthylalkohol die Bildung des krystallisierten Chlorophyllids herbeiführt.

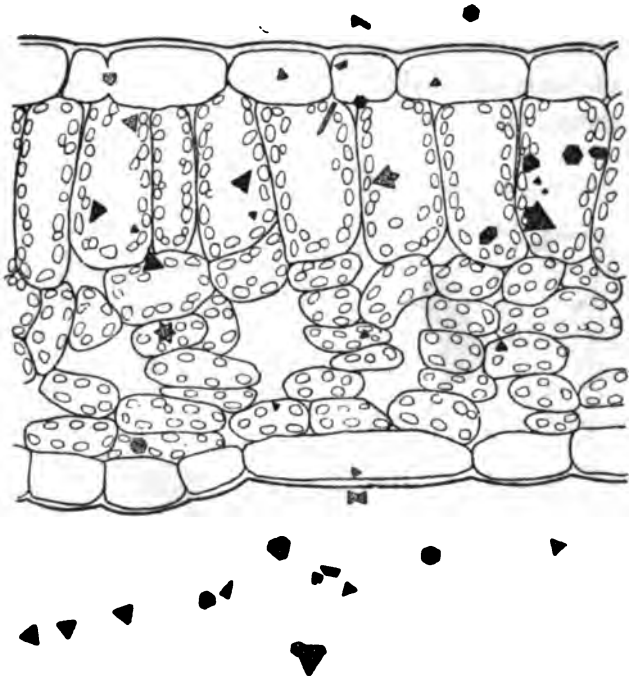


Fig. 7. Äthanolyse des Chlorophylls mit dem Schnitt eines Heracleumblattes.

Ein qualitativer Nachweis und eine Schätzung der Chlorophyllasewirkungen läßt sich am besten auf die stärker basischen Eigenschaften der beim Ansäuern entstehenden Methyl-, Äthyl- und freien Phäophorbide gründen, die aus ätherischer Lösung schon in 22 prozentige Salzsäure vollständig übergehen, während Phäophytin erst von 29 prozentiger und stärkerer Salzsäure gut extrahiert und spurenweise von 25 prozentiger Säure aufgenommen wird: wir nennen diesen Versuch die „Basizitätsprobe".

Wir filtrieren 1 ccm des zu prüfenden Extraktes ab und waschen das zugehörige Mehl erschöpfend nach, um von den schwer

löslichen Chlorophylliden nichts zu verlieren. Nach dem Überführen des Farbstoffs in Äther und Herauswacshen von Alkohol oder Aceton, schütteln wir mit 22 prozentiger Salzsäure gelinde durch. Wenn die Säure Farbstoff aufnimmt, war Abspaltung des Phytols erfolgt. Wird der Äther bei wiederholtem Extrahieren mit der Salzsäure rein gelb und verliert er die rote Fluorescenz vollständig, so war die enzymatische Umwandlung quantitativ.

Auch die Unlöslichkeit der einfachen Chlorophyllide in Petroläther und sogar in alkoholhaltigem Petroläther ermöglichst den Nachweis des Enzyms und die Bestimmung seiner Wirkung. Man braucht nur nach dem Abfiltrieren vom Pflanzenmehl die Überführung des Farbstoffs aus dem Extrakt in Petroläther durch langsamen Zusatz von Wasser zu versuchen, um die petrolätherunlöslichen Derivate auszufällen. Bei unversehrtem Chlorophyll nimmt der Petroläther alles Grüne auf; im Falle einer quantitativen Chlorophyllasewirkung ist er gelb. Die in der wässerigen und der petrolätherischen Schicht unlöslichen Chlorophyllide werden mit Talk gesammelt. Dann lassen sich die im Petroläther hinterbleibenden Anteile in alkoholisch-alkalischer Lösung mit der Talkportion colorimetrisch vergleichen.

3. Verbreitung des Enzyms.

Die Chlorophyllase ist in allen von uns untersuchten Pflanzenklassen verbreitet. Sie ist namentlich in sehr zahlreichen Dicotyledonenfamilien nachgewiesen worden, ferner in Monocotyledonen (Avena sativa), in Gymnospermen (Taxus baccata), Equisetales (Equisetum arvense), Filicales (Aspidium), Phäophyceae (Fucus) und Chlorophyceae (Ulva lactuca).

Es sind aber nur wenige Pflanzen, die sich wegen ihrer allgemeinen Verbreitung, ihres reichlichen Vorkommens und ihres großen Gehaltes an Chlorophyllase in allen Jahreszeiten als Material für die präparative Anwendung des Enzyms besonders eignen, nämlich:

Heracleum spondylium, Bärenklau;
Galeopsis tetrahit, Hohlzahn;
Stachys silvatica, Waldziest.

Auch Lamium maculatum, Datura stramonium und Melittis melissophyllum sind gut anwendbar.

Manche Pflanzen, wie Aesculus hippocastanum, enthalten in frischem Zustand reichlich Chlorophyllase, büßen aber die Wirksamkeit beim Trocknen rasch ein.

Eine weitere Schar von Pflanzen finden wir so arm an dem Enzym, daß auch bei langsamem Extrahieren und bei Versuchen, die eine längere Berührung der Extrakte mit den Blättern nötig machen, keine erhebliche Veränderung des Chlorophylls eintritt. Hierzu gehören:

Gras,
Platane,
Brennessel.

4. Anwendung des Enzyms.

Da das Enzym neben seinem Substrat in den grünen Pflanzenteilen vorkommt, so ist für viele Anwendungen der Chlorophyllase zur Alkoholyse und Hydrolyse die möglichst frische, ungetrocknete Blattsubstanz mit dem sich bildenden oder frisch gebildeten Extrakt in Berührung gebracht worden.

Hierauf beruht das Verfahren zur Gewinnung von Methylchlorophyllid und freiem Chlorophyllid, Kapitel IX, 3 und 4.

Die Blätter konnten in frischem Zustand wenige Stunden oder höchstens einen Tag nach dem Sammeln — in dieser Zeit lagen sie in kühlen Räumen ausgebreitet — im Laboratorium verarbeitet werden, zumeist in täglichen Chargen von 20—30 kg.

Die Verarbeitung der ungetrockneten Blätter erfordert infolge ihres Wassergehaltes einen außerordentlichen Verbrauch an Lösungsmitteln und großräumige Apparate. Zudem ist diese Arbeit abhängig von der Nähe des Standortes der geeigneten Pflanzen und von der Jahreszeit.

Daher ist oft die Verwendung des Mehles der getrockneten Blätter vorzuziehen.

Beispiele hierfür sind die Darstellung von Äthyl- und Methylchlorophyllid im Kapitel IX, 1 und 2 und die partielle Synthese des Chlorophylls aus Chlorophyllid mit Phytol, Kapitel VIII.

Die Trocknung soll rasch erfolgen, in 1—2 Tagen, in dünn ausgebreiteter Schicht, bei Temperaturen von höchstens 40° und unter Vermeidung von Sonnenlicht. Wir haben zumeist die Blätter über dem Dampfkessel des Laboratoriums getrocknet oder von den Kräutersammlern in Trockenspeichern trocknen lassen.

Die enzymatische Wirksamkeit der geeignetsten Pflanzen leidet erst bei längerem Aufbewahren des getrockneten Materials, doch ist es auch noch mit monate-, ja mit jahrelang aufbewahrtem Galeopsis oder Heracleum ziemlich gut gelungen, krystallisiertes Chlorophyll zu gewinnen.

Drei Jahre alte Blätter von Galeopsis oder Heracleum waren noch wirksam, und zwar betrug die halbe Umsetzungszeit bei der Äthanolyse nur das Vierfache als bei einem neuen Vergleichsmaterial. Im Extrakt der alten Blätter (80prozentiger Alkohol) fand beim Behandeln mit $^1/_{10}$ des zugehörigen Blattmehles in 10 Stunden bei 25° die Äthanolyse von 44% des Chlorophylls statt.

Wenn es sich nicht um präparative Verwendung, sondern um kinetische Versuche mit dem Enzym handelt (z. B. in den Abschnitten 6, 7, 8 dieses Kapitels), dann ist als Chlorophyllase das Mehl der bei Zimmertemperatur getrockneten Blätter nach zuerst raschem, sodann erschöpfendem Extrahieren des Chlorophylls mit 96prozentigem Alkohol, und zwar in alkoholfeuchtem Zustand, möglichst bald nach der Extraktion verwendet worden, mitunter auch einfach das Blattmehl ohne Vorbehandlung.

Die Menge des Enzyms bezeichnen wir dann mit dem Bruchteil des Pflanzenmehles, welches dem Chlorophyllgehalt des bei dem Versuche angewandten Extraktes entspricht. Z. B. lieferten uns 1 kg Galeopsis einen Extrakt mit 4,14 g Chlorophyll (entsprechend 3 g Äthylchlorophyllid), während der gesamte Chlorophyllgehaltdes Mehles 6,9 g betragen hat; als $^1/_{10}$-Enzym bezeichnen wir dann 60 g, nämlich $^1/_{10}$ desjenigen Materials, welches 4,14 g Chlorophyll enthält.

5. Bestimmung der Hydrolyse durch Trennung mit Alkali.

Der Verlauf der Hydrolyse läßt sich mit einer einfachen colorimetrischen Methode bestimmen, die auf der sauren Natur der freien Chlorophyllide beruht.

Nach der Reaktion führen wir Proben des Farbstoffes, z. B. 0,01 g, oder bei Versuchen in kleinem Maßstab die ganze Menge in Äther über (100 ccm) und extrahieren mit $n/_{50}$-KOH unter Zusatz von ein paar Kubikzentimeter Holzgeist den sauren Anteil, nämlich etwa dreimal mit 30—50 ccm. Ist viel Chlorophyllid gebildet, so scheidet sich sein Kaliumsalz oft in Form einer Emulsion an der Trennungsschicht von Lauge und Äther aus; es wird mit mehr verdünnter Lauge in Lösung gebracht. Die vereinigten alkalischen Auszüge bringen wir mit Methylalkohol auf 200 ccm; dadurch läßt es sich verhüten, daß die Lösung rasch mißfarbig wird. Dann verseift man das im Äther zurückgebliebene Chlorophyll durch Zusatz von 5 ccm methylalkoholischem Kali und verdünnt nach dem Wiederkehren der grünen Farbe gleichfalls mit 100 ccm Wasser und mit Holzgeist auf 200 ccm. Die beiden Lösungen werden im Colorimeter verglichen, dabei betragen die Fehler $\pm$ 2—3%.

In zwei Beispielen mit Heracleum unter gleichen Bedingungen fanden wir so in guter Übereinstimmung 70 und 71% hydrolysiertes Chlorophyll.

Um nach dieser Methode die Enzymwirkung eines Pflanzenmaterials zu untersuchen, sind folgende Bedingungen geeignet.

Die Hydrolyse wird in Aceton von 66 Volumprozent ausgeführt. Das Mehl der zur Gewichtskonstanz getrockneten Blätter (1 g) schütteln wir zunächst 5 Minuten lang mit 4 ccm reinem Aceton; diese Zeit genügt zum guten Extrahieren, und der Extrakt enthält nur unverändertes Chlorophyll. Dann werden 2 ccm Wasser unter Umschütteln hinzugefügt, wobei das Mehl aufquillt und sich dunkler färbt. Diese Masse bewegen wir im Thermostaten von 20° gewöhnlich 1 Stunde lang. Dann saugt man auf der Nutsche die Chlorophyllösung ab und wäscht mit 66prozentigem Aceton gründlich nach.

Bei der Untersuchung frischer Blätter bestimmen wir den Wassergehalt und wenden so viel Aceton an, daß die Lösung 66prozentig wird: z. B. gaben 5 g Blätter von Heracleum 1 g Trockensubstanz; sie wurden mit Quarzsand zerrieben und mit 8 ccm Aceton versetzt. Die Lösungen werden immer verdünnter als bei der Verarbeitung getrockneter Pflanzen.

Erstes Beispiel mit getrockneten Blättern von Heracleum. Die Pflanze ist im Oktober gesammelt und sofort im Exsiccator zwei Tage getrocknet worden. Nach $7^1/_2$ Minuten waren 30%, nach 15 Minuten 56% des Chlorophylls hydrolysiert.

Zweites Beispiel mit frischen (ungetrockneten) Blättern von Heracleum. Die Hydrolyse verlief langsamer, entsprechend der geringeren Chlorophyllkonzentration. Die Enzymwirkung leidet also bei Heracleum nicht durch das kurze Trocknen. Nach $7^1/_2$ Minuten waren 20, nach 30 Minuten 50% hydrolysiert.

6. Bestimmung der Alkoholyse mittels der Phytolzahl und Jodsilberzahl.

Der Gang der Alkoholyse kann an dem schwer löslichen Chlorophyllderivat, das aus der alkoholischen Lösung durch Einwirkung von Oxalsäure abgeschieden wird, ermittelt werden

durch quantitative Bestimmung des Phytols nach der im Kapitel XVII beschriebenen Methode sowie

durch quantitative Abspaltung der Methyl- und Äthylgruppe mit Jodwasserstoff nach dem Verfahren von Zeisel.

a) Phytolzahl. Beim Ansäuern der alkoholischen Lösung nach der enzymatischen Reaktion fällt das magnesiumfreie Derivat unvollständig aus. Es hat sich aber gezeigt, daß Phäophytin und Phäophorbid sich ungefähr in dem Verhältnis gemischt abscheiden, wie sie in der Lösung enthalten sind.

Eine Chlorophyllösung aus Brennesseln z. B. gab nach der Äthanolyse beim Ansäuern und zweitägigem Stehen 0,6 g Phäophytin mit der Phytolzahl 15,3; die Mutterlauge lieferte beim Eindampfen auf die Hälfte und zweitägigem Stehen weitere 0,5 g mit 15,1% Phytol. Ein Extrakt aus Galeopsis lieferte nach der Enzymreaktion 0,75 g beim Stehen abgeschiedenes Phäophytin mit der Phytolzahl 2,4; die Mutterlauge schied nach dem Einengen zum halben Volumen 0,45 g aus mit 3,8% unreinem Phytol.

Wir können uns daher oft damit begnügen, den bei zweitägigem Stehen der angesäuerten Chlorophyllösung ausfallenden Anteil des Phäophytins zu analysieren.

Aus der Phytolzahl (Z_u) des ausfallenden Gemisches von

Phäophytin und Äthylphäophorbid und der Phytolzahl (Z_a) des magnesiumfreien Derivats aus dem angewandten Extrakt oder Chlorophyllpräparat wird der Bruchteil von umgewandeltem Chlorophyll, d. i. die Umwandlungszahl u_I nach folgender Gleichung[1]) abgeleitet, ohne daß übrigens der Umwandlungsgrad mit dem Sinken der Phytolzahl proportional zunimmt.

$$u_I = \left(1 - \frac{Z_u}{Z_a(1 + 0{,}01180)(Z_a - Z_u)}\right) \cdot 100 . \qquad (I)$$

Für die Anwendung der Gleichung für monomolekulare Reaktion:

$$k = \frac{1}{t} \cdot l_n \frac{a}{a - u}$$

dient

$$\frac{a}{a - u} = \frac{Z_a(1 + 0{,}01180)(Z_a - Z_u)}{Z_u} \cdot 100 .$$

b) Jodsilberzahl. Chlorophyll und Phäophytin enthalten ein Methoxyl und nehmen in alkoholischer Lösung bei der Einwirkung der Chlorophyllase eine Äthoxylgruppe auf. Die teilweise umgewandelten Präparate enthalten also in wechselndem Verhältnis Methoxyl und Äthoxyl. Es ist daher unzweckmäßig, die Resultate als Methoxyl oder Äthoxyl anzugeben. Wir führen statt dessen den Begriff Jodsilberzahl ein, den Quotienten:

$$\frac{\text{gefundenes AgJ}}{\text{angewandte Substanz}} \cdot 100 .$$

Die theoretische Jodsilberzahl des Äthylphäophorbids, und zwar der Komponente a, des Hauptbestandteiles im Gemische von a und b, und ohne erheblichen Fehler diejenige des Gemisches ist:

$$\frac{469{,}6}{629{,}35} \cdot 100 = 74{,}6 .$$

Die Zahl des Phäophytins:

$$\frac{234{,}8}{879{,}6} \cdot 100 = 26{,}7 .$$

Zwischen diesen beiden Werten liegt die Jodsilberzahl eines alkoholysierten Präparates, die als J_u bezeichnet werden soll.

Die Umwandlungszahl u_{II} ergibt sich aus den Jodsilberzahlen nach folgender Formel[2]), worin D_a die Differenz der Jodsilberzahl

[1]) Ann. d. Chem. 378, 32 [1910].
[2]) Ann. d. Chem. 378, 34 [1910].

von Äthylphäophorbid und derjenigen (J_a) vom Phäophytin des angewandten Chlorophylls bedeutet:

$$u_{II} = \frac{1}{1 + \frac{74{,}6 - J_u}{(1 + 0{,}00830\, D_a)(J_u - 26{,}7)}} \cdot 100 . \qquad (II)$$

Anstatt die Umwandlung aus den Jodsilberzahlen vor und nach der Reaktion zu ermitteln, kann man auch das Ausgangsmaterial lediglich durch seine Phytolzahl (Z_a) kennzeichnen und dann die Umwandlung (u) mit Hilfe der Jodsilberzahl (J_u) in folgender Weise berechnen:

$$u_{III} = \frac{1}{1 + \frac{74{,}6 - J_u}{(1 + 0{,}01180 \cdot Z_a)(J_u - 26{,}8)}} \cdot 100 . \qquad (III)$$

Die Übereinstimmung der aus den Phytol- und Jodsilberzahlen abgeleiteten Umwandlungsgrade u_I und u_{II}, wie sie die nachfolgenden Beispiele zeigen, lehrt, daß das eintretende Äthoxyl genau äquivalent ist dem austretenden Phytol und zugleich wird dadurch die Brauchbarkeit beider Methoden erwiesen.

Alkoholyse von Phäophytin.

Werte für das angewandte Präparat: $Z_a = 30{,}9$; $J_a = 29{,}9$.

Werte für das umgewandelte Präparat: $Z_u = 11{,}0$; $J_u = 58{,}3$. $u_I = 71{,}2$; $u_{II} = 72{,}7$; $u_{III} = 72{,}6$.

Werte für dasselbe noch weiter alkoholysierte Präparat: $Z_u = 2{,}7$, $J_u = 70{,}2$, $u_I = 93{,}4$, $u_{II} = 93{,}4$, $u_{III} = 93{,}4$.

Diese beiden Arten von quantitativer Bestimmung sind nicht mit kleinen Versuchsproben auszuführen und sie erfordern längere Zeit. Daher sind sie zur Kontrolle von Versuchen in präparativem Maßstab nicht so geeignet wie die in den Abschnitten 2 und 5 angeführten Prüfungen.

7. Dynamik der Enzymwirkung.

Der Ermittlung geeigneter Versuchsbedingungen für Anwendungen der Chlorophyllase dienen Geschwindigkeitsmessungen unter verschiedenen Verhältnissen, welche den Einfluß der Lösungsmittel, besonders des Wassers, der Temperatur, des Alters der Enzympräparate und anderer Umstände kennen lehren. Die Bedingungen

für die Messung der Reaktionsgeschwindigkeit liegen hier besonders ungünstig wegen der Beschaffenheit des Enzyms, das außerordentlich verdünnt mit anderen Stoffen in der Form des ausgelaugten Pflanzenmehles angewandt wird, andererseits wegen der komplizierten und größtenteils unbekannten Zusammensetzung des Blätterextraktes, welcher das Substrat enthält.

Die Reaktion der Chlorophyllase findet nicht in einem homogenen System statt, aber die Diffusionsverhältnisse könnten derart sein, daß das heterogene System sich wie ein homogenes verhielte. Dann wäre es möglich, daß die Reaktion zwischen dem Chlorophyll und den Alkoholen, deren Konzentrationsänderung außer Betracht bleiben darf, oder dem Wasser wie eine monomolekulare verliefe. Die Versuche haben jedoch ergeben, daß die Reaktionskonstante

$$k = \frac{1}{t} \cdot l_n \frac{a}{a - u}$$

einen starken Gang hat, daß sie nämlich mit zunehmender Reaktionsdauer erheblich sinkt.

Die Erklärung hierfür ist einesteils darin zu suchen, daß das Enzym während der Reaktion zerstört oder geschwächt wird; denn bei wiederholter Anwendung wird seine Wirksamkeit geringer. Ferner erfährt möglicherweise ein Koenzym oder Aktivator, dessen Einfluß zutage getreten ist, im Verlaufe der Reaktion eine Schwächung. Endlich ist es wahrscheinlich, daß die Verhältnisse der Diffusion bei der eigentümlichen Beschaffenheit des enzymhaltigen Materials unter unseren Versuchsbedingungen einen störenden Einfluß auf die Geschwindigkeit ausüben.

Beispiele.

Die Extrakte sollen möglichst unversehrtes Chlorophyll enthalten, sie werden daher nach dem Nutschenverfahren rasch hergestellt. Die Konzentration der Lösungsmittel wird in Volumprozenten angegeben. Die im Pflanzenmehl enthaltene Feuchtigkeit ist bei der Bestimmung des Wassergehaltes der Extrakte berücksichtigt. Die Versuche wurden unter Schütteln bei konstanter Temperatur ausgeführt.

1. Hydrolyse.

Heracleum, exsiccatortrocken, mit ganzer Enzymmenge in 66prozentigem Aceton bei 20°. Versuchsanordnung und Bestimmung wie in Abschnitt 5.

Zeit in Minuten	u	$k \cdot 10^3$
15	45	7,52
30	75	8,68
60	91	7,55
120	98	6,17
240	99	—

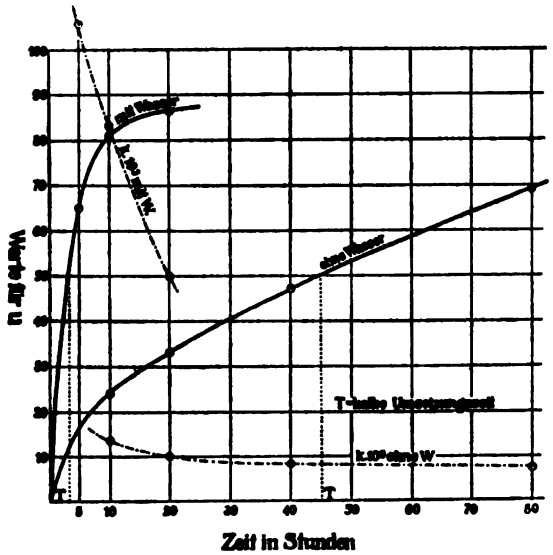


Fig. 8.

2. Äthanolyse (Fig. 8).

Heracleum (Ernte Anfang Mai) in 92prozentigem Alkohol bei 25° mit $^1/_{10}$-Enzym; 500 ccm Extrakt, 1,8 g Chlorophyll enthaltend, mit 27,1 g Blattmehl angesetzt.

$$Z_a = 31{,}5.$$

Zeit in Stunden	Z_a	u	$k \cdot 10^3$
10	25,6	24,0	27,5
20	23,2	33,1	20,0
40	19,1	47,1	15,9
80	12,0	69,0	14,7

Einfluß des Zusatzes von Wasser (dieselbe Figur):

Heracleum (Ernte Ende Mai) in 80prozentigem Alkohol bei 25° mit $^1/_{10}$-Enzym, wie oben.

$Z_a = 30{,}6.$

Zeit in Stunden	Z_u	u	$k \cdot 10^3$
5	12,9	65,1	210,7
10	7,4	81,0	166,1
20	5,4	86,4	99,8

Die Geschwindigkeit ist also viel größer. Noch sicherer tritt die Verbesserung durch den Zusatz von Wasser bei einem Parallelversuch mit gleichem Extrakt und zwar in 92- und in 80prozentigem Alkohol hervor.

Heracleum mit $^1/_{10}$-Enzym; 25°, 10 Stunden.

$Z_a = 30{,}6.$

In 92prozentigem Alkohol: $Z_u = 19{,}5$; $u = 43{,}7$; $k \cdot 10^3 = 57{,}4$.

In 80prozentigem Alkohol: $Z_u = 9{,}4$; $u = 75{,}4$; $k \cdot 10^3 = 140{,}3$.

Die halben Umsetzungszeiten lassen sich mit Anlehnung an die Kurven der Fig. 8 hinreichend genau schätzen; sie sind 14 und 4 Stunden.

Selbst bei so bedeutendem und noch größerem Wassergehalt der alkoholischen Lösung erfolgt neben der Alkoholyse nur spurenweise Hydrolyse.

Einfluß der Temperatur:

Das Temperaturoptimum für die Äthanolyse liegt niedriger, als es für die Lipasen aus Rizinussamen und Pankreas gefunden wird, nämlich bei ungefähr 20°.

Heracleum in 80prozentigem Alkohol mit $^1/_{10}$-Enzym; Zeit Stunden.

$Z_a = 31{,}9.$

20°	$Z_u = 23{,}4$	$u = 33{,}3$
25°	$= 25{,}6$	$= 25{,}3$
35°	$= 26{,}5$	$= 21{,}9$

Heracleum in 80prozentigem Alkohol mit $^1/_{10}$-Enzym; Zeit 5 Stunden.

$Z_a = 31{,}7.$

15°	$Z_u = 21{,}0$	$u = 41{,}2$
20°	$= 19{,}1$	$= 47{,}6$
25°	$= 21{,}6$	$= 39{,}1$

Schwächung des Enzyms:

Wir ermittelten zunächst die Geschwindigkeit für eine Darstellung von Enzym und Extrakt in 3 Versuchen von $2^1/_2$, 5 und 10 Stunden. Das Enzym von jedem Versuch ließen wir aufs neue $2^1/_2$ Stunden auf die ursprüngliche Chlorophyllösung einwirken. Es zeigte sich, daß in den $2^1/_2$ Stunden des ersten Versuches das Enzym ganz ungeschwächt geblieben ist. Das Enzym, welches 5 und 10 Stunden gearbeitet hatte, erwies sich als weniger wirksam, und zwar in dem Maße, daß der Unterschied zwischen den Konstanten dieser 3 Wiederholungsproben das Sinken unserer Reaktionskonstanten wenigstens teilweise erklärt durch die Schwächung des Enzyms während der Versuchsdauer.

Heracleum in 80prozentigem Alkohol bei 25°. 500 ccm Extrakt, 1,95 g Chlorophyll enthaltend, mit 30 g Blattmehl ($^1/_{10}$-Enzym) angesetzt.

$$Z_a = 31{,}9.$$

	Zeit in Stunden	Z_a	u	$k \cdot 10^3$
Versuch I	$2^1/_2$	26,0	23,8	108,7
„ II	5	23,0	34,8	85,4
„ III	10	17,0	54,7	79,1

Wiederholte Wirkung in $2^1/_2$ Stunden:

	Z_a	u	$k \cdot 10^3$
Enzym von Versuch I	25,9	24,2	110,7
„ „ „ II	27,2	19,2	85,4
„ „ „ III	28,1	15,7	68,3

Chlorophyllase einer Pflanze mit der Chlorophyllösung aus einer anderen.

Die an Chlorophyllase armen Pflanzen geben Extrakte, die bei der Alkoholyse und Hydrolyse schlechter reagieren, als die zum Enzym gehörenden Extrakte. Dieselben Pflanzen geben extrahierte Blattmehle, welche mit den für die Reaktion geeignetsten Lösungen geringeren Umsatz bewirken als gutes Enzymmaterial.

Zeit: 60 Minuten.

Brennesselmehl mit Brennesselextrakt: Hydrolyse 10%,
„ „ Heracleumextrakt: Hydrolyse 23%,
Heracleummehl mit Brennesselextrakt: Hydrolyse 62%,
„ „ Heracleumextrakt: Hydrolyse 91%.

VIII. Anwendung des Enzyms zur partiellen Chlorophyllsynthese[1]).

Wie die Ester- und Glyceridsynthese mit Pankreaslipase geglückt ist[2]), so ließ sich auch die Umkehrung der Alkoholyse mit Chlorophyllase, also die Umwandlung des Äthylchlorophyllids in den Phytolester erzielen. Da das Enzym die Gegenwart von Wasser fordert, worin Phytol unlöslich ist, so sind die Bedingungen für die Reaktion nicht günstig; die Ausbeute war gering.

In befriedigender Weise hat sich der wichtigere Fall, die Esterifizierung der freien Carbonsäure Chlorophyllid, namentlich mit Phytol, entsprechend der Gleichung:

$$[C_{32}H_{30}ON_4Mg]\,(CO_2CH_3)\,(CO_2H) + C_{20}H_{39}OH$$
$$= [C_{32}H_{30}ON_4Mg]\,(CO_2CH_3)\,(CO_2C_{20}H_{39}) + H_2O$$

mit einer sehr einfachen Versuchsanordnung verwirklichen lassen, noch ehe es geglückt war, das leicht zersetzliche Chlorophyllid in Substanz zu isolieren.

Wir digerieren das Mehl von Galeopsisblättern einige Tage lang mit feuchtem Äther. Der Phytolester wird hydrolytisch gespalten; die Phytolzahl sinkt vom Anfangswert 32,8 auf wenige Prozente. Nun fügen wir Phytol zu der mit dem Blattmehl angesetzten Ätherlösung. Dann wird in einigen Tagen ein großer Teil des Chlorophylls, nämlich ein Drittel bei drei Viertel, zurückgebildet, was aus dem Ansteigen der Phytolzahl hervorgeht.

---

[1]) Abh. XIII.

[2]) J. H. Kastle und A. S. Loewenhardt, Am. Chem. Journ. 24, 491 [1900]; H. Pottevin, compt. rend. 136, 1152 [1903]; 138, 378 [1904]; Bull. soc. chim. 35, 693 [1906]; M. Bodenstein und W. Dietz, Zeitschr. f. Elektroch. 12, 605 [1906] und W. Dietz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 52, 279 [1907].

Hydrolyse.

1 kg Mehl von Galeopsisblättern (Ernte August) wurde unter Zusatz von 20 g gefälltem Calciumcarbonat mit 2,2 l alkoholfreiem, feuchtem Äther angesetzt und unter zeitweisem Schütteln $3^1/_2$ Tage damit maceriert. Bereits nach $^1/_2$ Stunde ergab eine abfiltrierte Probe eine etwas zu niedrige Phytolzahl, nämlich 30,4.

Unserer Berechnung der Umwandlung legen wir nicht diese Anfangsphytolzahl, sondern den theoretischen Wert für Phäophytin a 33,7 zugrunde.

Nach der mehrtägigen Einwirkung zeigt das Chlorophyll veränderte Löslichkeitsverhältnisse; bringt man eine Probe aus dem Äther in alkoholische Lösung und versucht man daraus das Chlorophyll in Petroläther überzuführen, so wird der Farbstoff fast vollständig gefällt.

Das gebildete Chlorophyllid haben wir zur Bestimmung der Phytolzahl auf folgende Weise in Form seines magnesiumfreien Derivates isoliert. Wir schüttelten das Mehl mit dem Ätherextrakt gut an und trennten die Hälfte ab, um mit dem Rest die Einwirkung des Phytols zu untersuchen. Die abfiltrierte und nachgewaschene ätherische Lösung wurde auf $^1/_4$ l konzentriert, mit $^1/_2$ l nur 85prozentigen Alkohols (in höherprozentigem Alkohol wäre Phäophorbid zu beträchtlich löslich) versetzt und im Vakuum bei 25° auf 300—400 ccm eingeengt. Zur Reinigung schüttelten wir die alkoholische Chlorophyllösung mit 50 g Calciumcarbonat; dabei fiel eine große Menge gelber und farbloser Stoffe aus, und die Lösung hellte sich zu reinem Grün auf. Wir verdünnten die alkoholische Lösung auf 80% und wiederholten das Klären mit Calciumcarbonat. Endlich wurde mit Oxalsäure angesäuert und das magnesiumfreie Derivat aus Chloroform mit 85prozentigem Alkohol umgeschieden.

Den Grad der Hydrolyse und später den der Esterifizierung berechnen wir aus der Phytolzahl ähnlich wie früher den Verlauf der Alkoholyse. Die Formel vereinfacht sich, da wir hier Z_∞ = der theoretischen Phytolzahl Z_0 setzen können.

$$\frac{M_1}{M_2} = 1{,}4629\,,$$

M_1 und M_2 bedeuten die Molekulargewichte von Phäophytin a (879,6) und Phäophorbid a (601,3).

$$u = \frac{1{,}4629\left(1 - \frac{Z_u}{Z_o}\right)}{\frac{Z_u}{Z_o} + 1{,}4629\left(1 - \frac{Z_u}{Z_o}\right)} \cdot 100 .$$

Die Jodsilberzahlen der hydrolysierten Präparate fallen durchweg etwas zu hoch aus. Entweder ist bei der übrigens vorsichtigen und raschen Isolierung ein wenig Äthylalkohol eingetreten oder der Äther hat unter der Wirkung der Chlorophyllase in einem geringen Maße äthylierend gewirkt.

Esterifizierung mit Phytol.

Nach der Ausführung der Hydrolyse wurde die übrig gelassene Hälfte von Galeposismehl ($^1/_2$ kg) und -extrakt mit Phytol versetzt, und zwar mit 50 g, d. i. etwa 50 Mol. bezogen auf den Chlorophyllgehalt der Blätter. Wir ließen die Einwirkung 3 Tage dauern. Dann haben wir die ätherische Lösung vom Pflanzenmehl abfiltriert und ganz ebenso wie nach der Hydrolyse daraus eine konzentrierte alkoholische Lösung bereitet und diese geklärt. Hierauf säuerten wir mit Oxalsäure an und erhielten in einigen Stunden eine erste Fällung von Phäophytin. Die Mutterlauge hielt infolge ihres Gehaltes an Phytol noch eine erhebliche Menge von Phäophytin gelöst. Um den Rest abzuscheiden, führten wir die Substanz in Äther über und verdampften diesen nach Herauswaschen des Alkohols im Vakuum vollständig. Die hinterbleibende Lösung von Phäophytin in Phytol verdünnten wir mit 2 l Petroläther und ließen damit in der Kälte stehen. Das Phäophytin schied sich ziemlich vollständig aus, die petrolätherische Mutterlauge enthielt fast nur noch gelbes Pigment. Die zwei Fraktionen des Phäophytins oder genauer des Gemisches von Phäophorbid und Phäophytin haben wir vereinigt und zuerst aus konzentrierter Chloroformlösung mit 85prozentigem Alkohol umgefällt, sodann ein zweites Mal aus Chloroform mit Petroläther. So erhielten wir das Produkt rein; in der Chloroform-Petroläther-Mutterlauge blieben farblose Begleiter und Carotin.

Beispiel. a) Hydrolyse.

Die isolierte Lösung enthielt nach dem Klären 1,8 g Chlorophyll, berechnet als phytolhaltiges Chlorophyll. Die Ausbeute an Phäophorbid betrug 1,05 g, d. i. 85% der Theorie.

$$\text{Phytolzahl} \quad Z_u = 3{,}0,$$
$$\text{Jodsilberzahl} \quad J_u = 43{,}3.$$

Der theoretische Wert für Phäophorbid a ist 39,0.

Die Jodsilberzahl zeigt, daß nicht Alkoholyse, sondern Hydrolyse erfolgt ist.

Umwandlung u_1, nur aus der Phytolzahl bestimmt, = 94.

b) Esterifizierung.

Ausbeute an Chlorophyll in Lösung 2,0 g und 1,45 g zweimal umgeschiedenes Phäophytin, d. i. 85% der Theorie.

$$Z_u = 17{,}2.$$
$$J_u = 30{,}3.$$
$$u_2 = 35.$$

Von der gebildeten freien Carbonsäure haben sich also bei diesem Versuch 38%, bei einem anderen 73%, bei einem dritten 29% mit Phytol verbunden.

Das Chlorophyll ist bei der Hydrolyse und Synthese im Phytochrominkomplex intakt geblieben. Das magnesiumfreie Derivat des Reaktionsproduktes lieferte nämlich bei der Verseifung das normale Gemisch von Phytochlorin e und Phytorhodin g und keine anderen basischen Spaltungsprodukte.

Als wir parallel mit der Esterbildung durch Phytol mit Anteilen der ätherischen Lösung von hydrolysiertem Chlorophyll die Einwirkung von Äthylalkohol prüften, ergab die Esterifizierung mit 25 Molen ungefähr dasselbe Resultat wie mit der doppelten Zahl von Phytolmolekülen.

Es wird hierdurch erklärt, daß bei der Extraktion von Galeopsismehl mit gewöhnlichem, nicht ganz alkoholfreiem Äther die Borodinschen Krystalle in geringer Ausbeute erhalten werden[1]).

[1]) Ann. d. Chem. 358, 275 [1907] und 378, 59 [1910].

Bildung von Chlorophyll a aus Phytol und freiem Chlorophyllid a[1]).

Nachdem wir die unbeständigen und daher schwierig zu isolierenden freien Chlorophyllide kennen gelernt, ist es uns auf sehr einfache Weise gelungen, das natürliche Chlorophyll aus den beiden isolierten Bestandteilen, aus seinem Alkohol und der Carbonsäure zu bilden.

Wir brachten Chlorophyllid a mit Phytol in Lösung und versetzten diese mit etwas Mehl chlorophyllasereicher Blätter. An der Abnahme des sauren Anteils, den wir aus ätherischer Lösung mit $n/_{50}$-KOH extrahierten, konnte die Synthese des neutralen Esters verfolgt werden.

0,2 g Chlorophyllid a lösten wir in 4 ccm Aceton wegen seiner Schwerlöslichkeit in Phytol; die schön grünblaue Lösung wurde in 16 ccm Phytol eingetragen und mit 10 g lufttrockenem Mehl aus Heracleumblättern (d. i. $^1/_4$ des dem angewandten Chlorophyllid entsprechenden) vermischt. Den trägflüssigen Brei haben wir öfters umgerührt und davon von Zeit zu Zeit Proben von 2 g abgewogen und auf einer kleinen Nutsche mit viel Äther (100 ccm) extrahiert und ausgewaschen. Dann schüttelte man unter Zusatz von etwas Alkohol, um Emulsionen zu vermeiden, wiederholt mit 50—100 ccm $n/_{50}$-KOH gelinde durch, bis die wässerige Schicht farblos blieb, verdünnte die vereinigten Auszüge mit Sprit auf 500 ccm und verglich sie colorimetrisch mit der zu Beginn der enzymatischen Reaktion auf gleiche Weise hergestellten Lösung. Da die wässerig-alkalische Chlorophyllidlösung beim Stehen leicht mißfarbig wird, so entnimmt man dem Reaktionsgemisch mehrere solcher Anfangsproben und bewahrt sie in Form ihrer verdünnten ätherischen Lösungen im Dunkeln auf, um gleichzeitig mit der Versuchsprobe eine Vergleichslösung herzustellen.

Unter den oben angeführten Versuchsbedingungen mit trockenem Blattmehl war nach 1 und nach 2 Stunden noch kein deutliches Zurückgehen des sauren Anteils wahrzunehmen. Nach 24 Stunden war die Synthese bis zu 20% des angewandten Chlorophyllides vorgeschritten.

[1]) Unveröffentlicht.

Die Chlorophyllase wirkte in dem beinahe wasserfreien Medium nur sehr langsam, hingegen waren nach tüchtigem Umrühren mit 0,5 ccm Wasser in einem weiteren Tage 60% der ursprünglich vorhandenen Carbonsäure esterifiziert. Die Enzymreaktion hat damit schon nahezu den Gleichgewichtszustand erreicht; denn während eines weiteren Tages stieg die Ausbeute an Chlorophyll nur auf 65% und ging auch nicht weiter in 2 folgenden Tagen.

Die konzentrierte Lösung von Chlorophyllid a in Phytol bildet ohne Enzymzusatz auch bei tagelangem Stehen keinen Ester.

Die ätherische Lösung des gebildeten Chlorophylls zeigte die Merkmale des natürlichen Pigmentes: es war indifferent gegen verdünnte wässerige Alkalien, wie sein magnesiumfreies Derivat gegen 23prozentige Salzsäure (Basizitätsprobe), und es zeigte eine reingelbe Phase.

IX. Die präparativen Verwendungen der Chlorophyllase: Die Chlorophyllide.

In unseren ersten Untersuchungen ist der Phytolgehalt von Chlorophyll und Phäophytin ohne Gesetzmäßigkeit normal oder zu niedrig gefunden worden[1]), und für die Darstellung des phytolfreien „krystallisierten" Chlorophylls haben Willstätter und Benz ohne Kenntnis der für die Bildung maßgebenden Umstände ein empirisches Verfahren beschrieben. Mit der Chlorophyllase haben wir den Schlüssel für die Beziehungen zwischen phytolhaltigem und phytolfreiem Chlorophyll gefunden; dann war die Untersuchung der Enzymreaktion die Vorarbeit, um sie für präparative Zwecke nutzbar zu machen.

Das natürliche Chlorophyll abzuscheiden, war wegen seiner großen Löslichkeit und Zersetzlichkeit und des Fehlens von sauren und basischen Eigenschaften bis in die letzte Zeit so schwierig, daß es für die analytische Untersuchung und für die ersten Stufen des Abbaus vorzuziehen war, den Farbstoff in der Form der schwer löslichen und ausgezeichnet krystallisierenden einfacheren Chlorophyllide zu isolieren und anzuwenden. Zudem treten die Unterschiede in der Zusammensetzung zwischen der a- und b-Reihe schärfer zutage an den phytolfreien Verbindungen, mit welchen die Auflösung des natürlichen Gemisches in seine Komponenten zuerst ausgeführt worden ist.

Auch nachdem die neue im V. Kapitel beschriebene Methode es ermöglicht hat, das Chlorophyll selbst in beliebigem Maßstab und

[1]) Abh. VII und X.

reinem Zustand zu gewinnen, behalten die sogenannten krystallisierten Chlorophylle, die schönsten Substanzen der Chlorophyllgruppe, ihre Bedeutung als Ausgangsstoffe von zuverlässiger Reinheit, besonders für die ersten Umwandlungen des Pigmentes.

1. Äthylchlorophyllid („Krystallisiertes Chlorophyll").

J. Borodin[1]) hat im Jahre 1881 in mikroskopischen Blattschnitten beim Behandeln mit Äthylalkohol und Austrocknen unter Deckgläsern das krystallisierte Chlorophyll entdeckt und die Form der Krystalle schön beschrieben. Er hat die Frage aufgeworfen, ob die merkwürdigen Gebilde den natürlichen Farbstoff oder eine Verbindung desselben mit einem noch unbekannten Stoff darstellen.

N. A. Monteverde[2]), der die Borodinschen Krystalle für natürliches Chlorophyll, das amorphe aber für ein Zersetzungsprodukt hielt, hat (1893) das krystallisierte Präparat für die Beschreibung des Absorptionsspektrums dargestellt und dafür folgendes Verfahren mitgeteilt:

„Frische Blätter wurden ihrer stärkeren Nerven entledigt und mit einer Achatschere klein geschnitten, dann mit Alkohol gewaschen und mit kaltem 95prozentigem Alkohol behandelt. Nach 1 Stunde wurde die Alkohollösung filtriert und an der freien Luft verdunstet. Die sich ausscheidenden Krystalle befreite ich von allen fremden Beimischungen und Farbstoffen durch destilliertes Wasser und Benzin."

Diese anregenden Arbeiten von Borodin und Monteverde haben an keiner Stelle in der Literatur außer nochmals bei einem russischen Botaniker, M. Tswett, Würdigung gefunden, wohl deshalb, weil es zu keiner chemischen Untersuchung der Chlorophyllkrystalle gekommen und weil es späteren Autoren nicht gelungen ist, das Chlorophyll in der beschriebenen Form zu isolieren.

Willstätter und Benz haben 1907, den Angaben von Borodin und von Monteverde folgend, das krystallisierte Chlorophyll wieder aufgefunden und sind zu einem Verfahren gelangt, um dieses in großem Maßstab zu gewinnen.

[1]) Bot. Zeitung 40, 608 [1882].
[2]) Acta Horti Petropolitani 13, Nr. 9, 123 [1893].

Sie verwenden an Stelle frischer Blätter getrocknete, führen den Farbstoff aus dem alkoholischen Extrakt in Äther über und erzielen durch eine Reinigung dieser Lösung das Auskrystallisieren.

A. Gautier[1]) erinnerte später daran, daß er schon vor den Beobachtungen von Borodin und Monteverde das krystallisierte Chlorophyll isoliert[2]) und daß er auf Grund des Phosphatgehaltes der Asche seiner Präparate die wesentliche Rolle des Phosphors im Chlorophyll erkannt habe. Beim Vergleich der veröffentlichten Zusammensetzung von Gautiers Produkt mit den Alkylchlorophylliden:

Chlorophyll von Gautier		Äthylchlorophyllid (kryst. Chlorophyll nach Borodin)	
C	73,97		68,57
H	9,80		5,97
N	4,15		8,80
Asche, Phosphate	1,75	Asche (= MgO)	5,92

zeigt sich indessen, daß das Chlorophyllpräparat von Gautier, das überdies saure Eigenschaften besaß und lösliche Alkalisalze bildete, ein Zersetzungsprodukt war.

Das Verfahren.

10 kg Mehl der Blätter von Galeopsis tetrahit werden mit 20 l 96prozentigem Alkohol 2—3 Tage lang ausgezogen, dann abgesaugt und nachgewaschen. Aus dem Extrakt wird durch Vermischen mit 20—25 l Äther und Hinzufügen der zur Beseitigung der Hauptmenge des Alkohols erforderlichen Menge Wasser (60 l mit $^1/_4$ l gesättigter Kochsalzlösung) eine ätherische Lösung bereitet. Sie enthält noch unangenehme, schwer zu entfernende Verunreinigungen, eine indifferente schleimige Substanz, die das weitere Herauswaschen des Alkohols durch die Bildung von Emulsionen verhindert. Zur Beseitigung des Schleimes schüttelt man die Flüssigkeit wiederholt und stundenlang mit Klärmitteln, am besten drei- bis viermal mit je einem ganzen Kilo Talk. Ein Rest der Verunreinigung bleibt allerdings auch dann noch im

[1]) Bull. soc. chim [4] 5, 319 [1909].
[2]) Compt. rend. 89, 861 [1879].

Äther zurück, aber er verursacht beim Ausschütteln mit Wasser keine lästigen Emulsionen mehr und wird dabei nahezu entfernt. Die Lösung ist noch fünfmal mit je 20 l Wasser durchzuschütteln und ihr Volumen dabei durch Nachfüllen von Äther unvermindert zu erhalten. Schließlich engt man die ätherische Lösung im Wasserbade auf 3 l ein. Die Hauptmenge krystallisiert dann beim Stehen in einigen Stunden aus; sie wird auf dem Filter mit Äther gewaschen zur Befreiung von Mutterlauge und gelben Begleitern, bis die Waschflüssigkeit rein hellgrün abläuft. Das Filtrat liefert bei stärkerem Einengen weitere Krystallisationen von wenig geringerer Reinheit.

Die Ausbeute betrug 17 g, wovon 13 als erste Krystallisation isoliert waren. Beim Verarbeiten kleinerer Mengen ist dieser Betrag leicht zu übertreffen.

Eine Verbesserung dieses Verfahrens von Willstätter und Utzinger[1]) zieht die Nutzanwendung aus der Erkenntnis des enzymatischen Prozesses und erzielt die Vervollständigung der Alkoholyse, auch wird das umständliche Reinigungsverfahren mit Talk vereinfacht. Zwei Punkte der Vorschrift werden als wesentlich erkannt:

1. Genügend lange Einwirkung des Blattmehls auf den Extrakt,
2. Zusatz von Wasser behufs Begünstigung der Enzymreaktion.

2 kg gemahlene Blätter einer chlorophyllasereichen Pflanze werden mit 4 l Sprit angesetzt. Nach einigen Stunden tropft man unter Umschwenken 400 ccm Wasser zu und läßt dann unter häufigem Umschütteln die Alkoholyse fortdauern. Ihren Gang kontrolliert die Reagensglasprobe durch Überführen des Chlorophylls in Petroläther; hieraus scheidet sich der Farbstoff quantitativ aus, wenn die Abspaltung des Phytols vollständig geworden ist. Dies kann noch am gleichen Tage und wird jedenfalls bis zum nächsten Morgen eingetreten sein.

Der Farbstoff wird aus der abgesaugten alkoholischen Lösung in Äther übergeführt und der Alkohol in der Hauptmenge herausgewaschen. Man darf dabei nicht stark schütteln, weil sonst

[1]) Ann. d. Chem. 382, 142 [1911].

Emulsionen eintreten. Dann wird die ätherische Lösung mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft, bis sie dickflüssig zu werden beginnt. Ohne Rücksicht auf die etwaige Abscheidung bildet man durch Zusatz von Talk einen dünnen Brei, schüttelt kurze Zeit und läßt ihn einen halben bis ganzen Tag stehen. Dann wird auf der Nutsche scharf abgesaugt und gründlich mit Äther nachgewaschen, bis dieser rein und ganz hellgrün abläuft. Der Talk ist ganz durchsetzt mit schön ausgebildeten mikroskopischen Krystallen, sechs- und dreieckigen, und er enthält nichts von den gelben Pigmenten.

Zur Isolierung der Chlorophyllkrystalle wird der Talk in möglichst kurzer Zeit, 10—15 Minuten, mit nicht völlig absolutem Alkohol extrahiert. Da der Alkohol zwar nicht im Extrakt, aber in der reinen Lösung auf den Farbstoff einwirkt und ihn durch Allomerisation unkrystallisierbar macht, so wird die erhaltene Lösung schnell mit Äther vermischt und der Alkohol vollständig herausgewaschen. Aus der ätherischen Lösung krystallisiert bei mäßigem Einengen von gelben und farblosen Beimischungen freies Chlorophyllid.

Neues Verfahren[1]).

Bei Willstätter und Utzinger war die enzymatische Alkoholyse vollkommen, aber die Isolierung geschah noch umständlich und mit Verlust. Unsere Abänderung erhöht die Ausbeute und ermöglicht es, die beiden gelben Pigmente ohne Mühe und beinahe vollständig als Nebenprodukt zu gewinnen.

Während der Enzymreaktion krystallisiert ein Teil des Chlorophylls im Pflanzenmehl aus. Anstatt mit Alkohol waschen wir nach dem Abfiltrieren des Extraktes mit Aceton nach, das auch etwas wasserhaltig werdend Äthylchlorophyllid noch leicht und schnell löst. Aus dem gesamten Filtrat wird der Farbstoff nun nicht mehr in Äther übergeführt, sondern langsam mit Wasser in Krystallen gefällt, die sich von Farblosem und Gelbem frei waschen lassen.

---

[1]) Unveröffentlicht.

Das Mehl von Heracleum-, Galeopsis- oder Stachysblättern wird mit nur 90prozentigem Alkohol angesetzt, 1 kg mit 2 l, und unter zeitweisem Umschütteln etwa 12 Stunden stehen gelassen.

Schon nach wenigen Stunden zeigt die „Basizitätsprobe" (Kap. V, Abschn. 5) bei gutem Enzymgehalt eine 80prozentige Alkoholyse an, nach 12 Stunden soll eine Probe, in Äther übergeführt, an 22prozentige Salzsäure allen Chlorophyllfarbstoff als Äthylphäophorbid a und b abgeben, so daß die Ätherschicht durch zweimaliges Ausziehen mit dieser Säure rein gelb und frei von Fluorescenz wird.

Zugleich ergibt eine Prüfung mit Alkali, daß kein freies Chlorophyllid entstanden ist. Der Wassergehalt des Alkohols bewirkt nicht in irgend erheblichem Maße neben der Umesterung Hydrolyse. Eine in Äther übergeführte Extraktprobe färbt nämlich in guten Versuchen $n/_{100}$-KOH beim Durchschütteln nicht an.

Nach Beendigung der Enzymreaktion filtriert man auf der Nutsche und wäscht mit Aceton nach, mit $2^1/_2$ l, und zwar halbliterweise unter abwechselndem kurzen Macerieren und Absaugen, wobei das Lösungsmittel Grünes und Gelbes quantitativ aus dem Mehl aufnimmt.

Die vereinigte Alkohol- und Acetonlösung wird mit 150 g grobem Talk versetzt und im Laufe einer Stunde unter Umrühren mit $4^1/_2$ l Wasser verdünnt. Das Chlorophyllid scheidet sich mit vielen Beimischungen in schönen, metallisch glänzenden Kryställchen aus, die der angewandte Talk bei einigem Stehen sammelt. Wir filtrieren auf der Nutsche durch eine weitere dünne Schicht von grobem Talk. Der gesamte Talk wird mit $^1/_4$ l 55prozentigem Aceton und dann $^1/_4$ l 55prozentigem Alkohol gewaschen, an der Pumpe scharf abgesaugt und sogleich auf der Nutsche durch sehr rasche Extraktion mit $1^1/_2$ l Petroläther und darauf mit $^1/_2$ l Äther noch weiter gereinigt. Die beiden Auszüge von schmutzig-gelbgrüner Farbe enthalten neben sehr viel Farblosem alles Xanthophyll und Carotin; sie werden zusammen nach einer Reinigung mit methylalkoholischer Kalilauge zur Fraktionierung der beiden gelben Pigmente mit Holzgeist verwendet (siehe Kap. XII, Abschn. 2).

Der Äther fließt bei dieser Extraktion zur Reinigung des Talks zuletzt schön hellgrün ab, nimmt aber sehr wenig Chlorophyll fort. Der vor dem Waschen mit Petroläther und Äther olivbraune Talk ist grau geworden und erscheint unter dem Mikroskop ganz erfüllt von den charakteristischen drei- und sechseckigen Kryställchen.

Der Talk wird endlich extrahiert mit $^1/_4$ l absolutem Alkohol, der zur Verhütung der Allomerisation mit 0,005 g Oxalsäure versetzt ist, und das tiefgrüne Filtrat mit 3—4 l Äther vermischt. Durch sechsmaliges Waschen mit je 2 l Wasser befreien wir den Äther quantitativ von Alkohol und dampfen ihn nach kurzem Trocknen mit geglühtem Natriumsulfat auf $1^1/_2$ l ein. Man filtriert die Lösung noch einmal möglichst rasch und destilliert den Äther weiter langsam bis auf 20 ccm ab, aber in einem nicht zu heißen Wasserbad, weil sich sonst der Farbstoff in Krusten an der Gefäßwand ansetzt. Während des Eindampfens und bei kurzem Stehen krystallisiert das Äthylchlorophyllid schön aus. Das Präparat ist rein, die Ausbeute beträgt 4,5—5 g, also ungefähr 1 g bezogen auf 1 kg frischer Blätter, d. i. mehr als 90% ihres Chlorophyllgehalts.

In einer Portion lassen sich mit Laboratoriumshilfsmitteln 2 kg Blattmehl verarbeiten und 3 Chargen im Tag bewältigen, abgesehen von der Gewinnung der wertvollen gelben Nebenprodukte.

Äthylchlorophyllid aus isoliertem Chlorophyll haben Willstätter und Hug[1]) mittels der Chlorophyllase erhalten.

Die Lösung von 1 g Reinchlorophyll in 200 ccm 90prozentigem Alkohol wurde 3 Tage mit 15 g Enzymmaterial geschüttelt. Dieses war aus 100 g trockenen Galeopsisblättern gewonnen, das Mehl mit Alkohol erschöpfend ausgezogen und daraus nach 24stündigem Stehen mit $^1/_2$ l Alkohol durch Schlämmen das feinste Pulver isoliert.

Unter diesen Bedingungen war gemäß der Phytolzahl 13,6 des magnesiumfreien Derivates 70% vom Chlorophyll alkoholysiert.

Das gebildete krystallisierte Chlorophyll ist rein isoliert, das abgespaltene Phytol analytisch identifiziert worden.

---

[1]) Ann. d. Chem. 380, 210 [1911].

2. Methylchlorophyllid aus trockenen Blättern[1]).

Bei der Ausführung der Methanolyse mit getrockneten Blättern waren unerwartete Hindernisse zu überwinden. Im wasserarmen Holzgeist ist das Enzym wenig wirksam, andererseits wird das Chlorophyll von wasserhaltigem Holzgeist nur schlecht extrahiert und in Lösung gehalten. Auch Aceton-Holzgeist ist als Lösungsmittel ungenügend.

Der Erfolg des Verfahrens hängt von der Anwendung eines Gemisches von Aceton, Wasser und Holzgeist ab, das gut extrahiert und in welchem die Enzymreaktion gut verläuft. Aceton mit beträchtlichem Wassergehalt extrahiert das Chlorophyll ausgezeichnet; bei Gegenwart von Wasser verläuft auch die Enzymreaktion leicht, indessen darf in diesem Gemische das Wasser gegenüber dem Holzgeist nicht derart überwiegen, daß die Hydrolyse beträchtlich wird neben der Methanolyse.

Bei der Einwirkung eines Gemisches von 60 Volumprozent Aceton, 10 Methylalkohol und 30 Wasser auf Heracleummehl war in 2 Tagen Phytol quantitativ abgespalten, aber fast nur durch Hydrolyse, also ohne Bildung der Methylverbindung.

Das geeignetste Verhältnis der Lösungsmittel ist eine Mischung von:

80 Volumprozent Aceton,
16 Holzgeist und
4 Wasser.

Mit dem üblichen Feuchtigkeitsgehalt der Blätter von 7% ergibt sich folgende volumprozentige Zusammensetzung der Flüssigkeit:

78 Aceton, 15 Holzgeist, 7 Wasser.

Darin verhält sich der Holzgeist zum Wasser = 2 : 1 ungefähr wie bei der Methanolyse mit frischen Blättern.

Das Aceton dient nun als Lösungsmittel und die Alkoholyse ist nur abhängig vom Verhältnis des Methylalkohols zum Wasser.

2 kg Blattmehl von Heracleum werden mit dem Gemisch von 3,2 l Aceton und 0,8 l 80prozentigem Methylalkohol in einer

[1]) Unveröffentlicht.

Pulverflasche nach und nach angerührt und unter zeitweisem Umschütteln ungefähr 40 Stunden stehen gelassen, je nach der enzymatischen Wirksamkeit des Materials etwas kürzer oder länger, indem man die Beendigung der Methanolyse im Reagierglas kontrolliert. Zu diesem Zweck filtriert man eine Probe ab, führt den Farbstoff in Äther über und prüft mit 22prozentiger Salzsäure.

Wenn diese Basizitätsprobe das Ende anzeigt, dann filtrieren wir den tiefgrünen Brei auf der Steinzeugnutsche über Koliertuch ab. Nun enthält das Mehl neben fast allem Gelben einen großen Teil (rund $^1/_3$) des krystallisierten Chlorophylls; es ist nicht leicht zu extrahieren, zumal die Pflanzensubstanz viel Wasser absorbiert hat. Wir ziehen daher auf der Nutsche weiter mit 4—5 l Aceton aus unter abwechselndem Macerieren und Saugen mit Maschinenvakuum, und zwar langsam, etwa im Laufe einer Stunde. Schon die ersten 4 l des Lösungsmittels genügen für den grünen Farbstoff; um die gelben Pigmente vollständig auszuziehen, braucht man noch etwas mehr Aceton.

Das gesamte Filtrat, 6—7 l, wird in einem weiten Gefäß mit 300 g grobgemahlenem Talk versetzt und mit einem breiten Glasstreifenrührer in Bewegung gehalten, während wir aus einem Scheidetrichter langsam (in $1^1/_2$ Stunden) 7 l Wasser einfließen lassen. Dabei krystallisiert das Methylchlorophyllid am Rührer, an der Gefäßwand und auf dem Talk aus in glänzenden, mit bloßem Auge erkennbaren Krystalldrusen und einzelnen wohlausgebildeten Blättchen, vermischt mit den gelben und orangeroten Krystallen der Carotinoide.

Bei zweistündigem Stehen hellt sich die Flüssigkeit zu schwachem Gelbgrün auf. Nun filtriert man durch eine dünne Talkschicht und wäscht nach mit $^1/_2$ l 50prozentigem Aceton, sodann mit ebensoviel 50prozentigem Alkohol. Der olivbraune Talk wird scharf abgesaugt, mit 2 l Petroläther (0,64—0,66) kurz und kräftig geschüttelt, wieder auf die Nutsche gebracht und mit je 1 l Petroläther und Äther nachgewaschen. Es geht nicht an, diese wichtige Reinigung durch Ausziehen mit Petroläther einfach auf der Nutsche vorzunehmen. Denn dabei mischt sich anfangs die große Menge der farblosen Begleitstoffe mit dem Petroläther zu einer Lösung,

die beim Passieren der ziemlich hohen Talkschicht viel Chlorophyllid wegnimmt. Wird aber das Farblose beim Anschütteln in der Flasche mit viel Petroläther verdünnt, so geht nur sehr wenig vom grünen Farbstoff in Lösung.

Aus dem so gereinigten Talk extrahieren wir mit 0,8 l absolutem Alkohol, der zum Schutz vor Allomerisation 0,02 g Oxalsäure enthält, das Methylchlorophyllid und isolieren es gleich wie die Äthylverbindung (siehe Abschn. 1).

Auch die Ausbeute ist dieselbe wie dort, nämlich fast 5 g aus 1 kg trockener oder 1 g aus dem Kilogramm frischer Blätter.

Die Mutterlauge der Krystallisation enthält neben wenig Methylverbindung nur sehr wenig saueres Chlorophyllid (Prüfung mit $n/_{100}$-KOH), das isolierte Präparat ist davon frei.

Die petrolätherisch-ätherische Waschflüssigkeit hat aus dem Talk die Gesamtmenge der in den Blättern enthaltenen gelben Pigmente extrahiert und ist das beste Material für ihre Isolierung.

3. Methylchlorophyllid aus frischen Blättern[1]).

Unser Verfahren geht aus von der „Methode für die Verarbeitung frischer Blätter", die Willstätter und Isler beschrieben haben[2]). Während es früher nicht mit Sicherheit gelungen war, beim Zerkleinern frischer Blätter Veränderungen des Chlorophylls zu vermeiden, führte eine Vorbehandlung zu gleichmäßigen Resultaten bei den verschiedenen Pflanzen und erleichterte sehr die Verarbeitung. Sie ermöglichte die Gewinnung von Chlorophyllösungen mit ganz unversehrtem Phytochromin.

Die Methode von Willstätter und Isler besteht in der Behandlung mit wasserhaltigem Holzgeist von einer Konzentration, mit welcher sich noch kein Chlorophyllextrakt bildet. Man verwendet dafür den Alkohol in solcher Menge und Stärke, daß er durch den Wassergehalt der Blätter ($^4/_5$ ihres Gewichts) hinreichend verdünnt wird, um nicht beträchtlich extrahierend zu wirken. Das Protoplasma wird abgetötet, die Eiweißstoffe werden koaguliert und manche Fermentwirkungen gehemmt. Die Blätter werden

[1]) Ann. d. Chem. 387, 339 [1912].
[2]) Ann. d. Chem. 380, 171 [1911].

dadurch gehärtet und lassen sich mit der Syenitwalzenmühle ausgezeichnet mahlen, ohne daß Erhitzung eintritt. Das Material wird derart entwässert, daß es ohne weiteres das Chlorophyll an Alkohol abgibt und in einer Operation genügend extrahiert wird.

Verschiedenartige Pflanzen zeigen bei dieser Behandlung einen interessanten Unterschied. Die einen, z. B. Brennessel, Platane, Holunder, verlieren nur langsam einen kleinen Teil des Chlorophylls. Die Blätter werden intensiver grün und liefern nach dem Abschleudern sehr gute Ausbeute an Chlorophyllösung.

Bei einer anderen Gruppe von Pflanzen, deren typische Vertreter Galeopsis und Heracleum sind, also gerade bei den chlorophyllasereichen, werden die Blätter schnell gebleicht. Es erfolgt die enzymatische Alkoholyse; dabei geht das phytolhaltige Chlorophyll zunächst in Lösung und das phytolfreie krystallisiert rasch aus, zumeist im Blatt (siehe Kap. VII, Anschn. 2).

Auf solche Weise erhielten wir bei dem Transport von grünen Algen (Ulva lactuca) aus Neapel in einem Fasse mit wasserhaltigem Holzgeist zwar die Alge entfärbt, aber das Chlorophyll abgeschieden als Sediment mikroskopischer Krystalle des Methylesters.

Unser Ausgangsmaterial für Methylchlorophyllid und freies Chlorophyllid sind die ohne Stiel gepflückten Blätter der durch ihren Chlorophyllasegehalt ausgezeichneten Pflanzen.

20 kg Heracleum legen wir unter abwechselndem Einfüllen von Blättern und Flüssigkeit in 2 Steinzeugtöpfen mit aufgeschliffenem Deckel in 32 l Holzgeist, der etwa 66prozentig wird durch den Wassergehalt der Blätter, da diese nur ein wenig mehr als 20% Trockensubstanz enthalten. Die Blätter müssen gründlich benetzt und während der Dauer der Behandlung mit dem Holzgeist durchgearbeitet werden. Man läßt das Lösungsmittel so lange einwirken, bis die Blätter ganz entfärbt sind; die Zeitdauer ist je nach dem Chlorophyllasegehalt der Ernten verschieden, gewöhnlich beträgt sie 2—3 Stunden. Dann nimmt man die Blätter heraus, sie werden abgepreßt und in einer großen Zentrifuge von anhaftendem Holzgeist befreit. Dann breiten wir sie in dünner Schicht in Trockenräumen aus und mahlen sie nach dem Trocknen; die Ausbeute an dem hellolivfarbigen Mehl beträgt 3,5—3,6 kg.

Die methylalkoholischen Flüssigkeiten werden vereinigt und mit etwas Talk (200 g) angerührt, der den schleimhaltigen feinen Niederschlag sammelt und gut filtrierbar macht. Den abfiltrierten Talk trocknet man im Vakuumexsiccator.

Verarbeitung des Blattmehles. Für die Extraktion ist es notwendig, das Mehl der mit Holzgeist behandelten Blätter in kleineren Chargen (3 Portionen von etwa 1,2 kg) zu verarbeiten, damit das Chlorophyll möglichst kurz in alkoholischer Lösung bleibt; die Allomerisation des Chlorophylls würde sich nämlich hier durch geringes Ansäuern des Alkohols nicht verhüten lassen, da das übrigens amphoter wirkende[1]) Pflanzenmehl Säure schluckt.

Das Mehl wird trocken auf die Nutsche gebracht, festgestampft und mit der Pumpe angesaugt, dann lassen wir so lange Äther (etwa 3 l) durchlaufen, als er gelbe Pigmente herauslöst; zugleich mit diesen werden viele farblose Stoffe beseitigt, so daß man nachher einen reinen Extrakt gewinnt. Der Äther läuft zuerst stark gelb, dann gelbgrün und schließlich rein hellgrün ab, er enthält fast kein phytolhaltiges Chlorophyll, aber eine nicht unbeträchtliche Menge Methylchlorophyllid, die man ihm durch starkes Einengen und Versetzen mit Talk entzieht. Es ist zweckmäßig, diesen Talk separat zu verarbeiten, weil gerade darin ein an der Komponente b reicheres Chlorophyllidgemisch enthalten ist. Es wird mit Äther gewaschen, mit absolutem Alkohol extrahiert und das Chlorophyllid in Äther übergeführt; so lieferte der Vorextrakt aus den 3,6 kg Mehl eine Krystallisation von 1,25 g.

Sofort nach dem Vorextrahieren mit Äther gießen wir auf das Mehl absoluten Alkohol auf, und zwar etwa $^1/_2$ l auf einmal; wir lassen ihn langsam in das Mehl eindringen und nach einer kleinen Pause saugen wir ihn scharf ab. Dann wird das Filtrat sogleich aus der Saugflasche herausgenommen, sofort durch Versetzen mit Äther und Wasser in Äther übergeführt, während zugleich die Extraktion an der Pumpe mit weiteren halben Litern Alkohol ihren Fortgang nimmt. Im ganzen dienen 4 l Alkohol zur Extraktion der 1,2 kg

[1]) Ann. d. Chem. 378, 50 [1910].

Blattpulver, und der Extrakt wird in 5 l ätherische Lösung übergeführt. Den Äther haben wir sechs- bis siebenmal mit sehr viel Wasser gründlich gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und auf 2 l eingeengt. Wir filtrierten nochmals und konzentrierten die Lösung, in der bereits die Krystallisation begann, bis auf 100 ccm. Das Methylchlorophyllid schied sich in schön reinem Zustand als lockeres Krystallmehl rhombischer Blättchen aus. Die Substanz enthielt weder gelbe noch farblose Beimischungen und sie gab bei der Spaltung ausschließlich Phytochlorin e und Phytorhodin g, nichts schwächer Basisches. Die ätherische Mutterlauge ist hellgrün, sie enthält eine geringe Menge phytolhaltigen Chlorophylls und eine Spur freien Chlorophyllids.

Die Ausbeute an Methylchlorophyllid aus dem gesamten Mehl betrug $12^1/_4$ g. Die Komponenten a und b sind (bestimmt mittels der Spaltungsprodukte Chlorin und Rhodin) in dem Gemische ungefähr im Verhältnis 2 : 1 enthalten. Aber bei fraktionierter Krystallisation ändert sich das Verhältnis wesentlich. Die ersten Ausscheidungen sind reich an b (z. B. enthalten sie 50% davon und noch mehr), die späteren sehr reich an a (z. B. 80%).

Verarbeitung der Talkportion. Der Talk wird auf einer kleinen Nutsche mit Äther vorextrahiert, der Gelbes und andere Beimischungen herauslöst. Dann wird er gleichfalls auf der Nutsche mit absolutem Alkohol ausgezogen und das Chlorophyllid aus dem Filtrat sofort in Äther übergeführt. Die gewaschene und getrocknete Lösung engt man zur Krystallisation ein: Ausbeute 1,1—1,2 g.

Im ganzen hat also bei diesem Versuch 1 kg der frischen Blätter $^3/_4$ g reines Methylchlorophyllid geliefert. Diese Ausbeute blieb ziemlich gleichmäßig bei der Verarbeitung von 500 kg Heracleumblättern.

4. Freies Chlorophyllid aus frischen Blättern[1]).

Während die Darstellung von Methylchlorophyllid einfacher und sparsamer aus trockenen Blättern geschieht, ist man für die Gewinnung des freien Chlorophyllids auf die Verarbeitung der frischen Blätter angewiesen. Die Carbonsäure ließ sich nämlich infolge

[1]) Ann. d. Chem. 387, 359 [1912].

ihrer Zersetzlichkeit aus den konzentrierten, weniger reinen Lösungen nicht isolieren, wie sie bei der enzymatischen Hydrolyse mit Blattmehl erhalten werden. In konzentrierter Lösung verwandelt sich Chlorophyllid zu leicht in Phäophorbidmagnesium.

Schon in feuchten ätherischen Extrakten trockener Blätter wird das Chlorophyll unter der Einwirkung der Chlorophyllase hydrolytisch gespalten und zwar betrifft die Reaktion gleich der Alkoholyse nur ein einziges Carboxyl.

Viel rascher und glatter verläuft die Hydrolyse mit frischen Blättern unter ähnlichen Bedingungen wie die Methanolyse. Die Blätter der an Chlorophyllase reichen Pflanzen werden statt mit wasserhaltigem Holzgeist mit einem wasserhaltigen indifferenten Lösungsmittel, nämlich Aceton, behandelt. Das Chlorophyll wird quantitativ hydrolisiert und zugleich aus den Blättern extrahiert, so daß es beim Verdünnen des Acetons mit Wasser schon in ziemlich reinem Zustand krystallinisch ausfällt, natürlich als Gemisch der beiden Komponenten a und b.

24 kg frische Heracleumblätter werden in 3 Steinzeugtöpfen in 29 l reines Aceton eingelegt, das durch die Feuchtigkeit der Blätter etwa auf einen Wassergehalt von 33% gebracht wird. Sogleich werden die Blätter durch den Austritt von Chlorophyll aus den Chloroplasten tiefgrün; schon nach einer halben Stunde färbt sich das Lösungsmittel schön an, und zwar besteht bereits der erste Anteil des austretenden Farbstoffs aus freiem Chlorophyllid. Versetzt man eine Probe dieses Extraktes mit Äther und viel Wasser, so entsteht eine ätherische Lösung, die alles Grüne an $n/_{100}$-KOH abgibt. Nach 1 Stunde haben die Blätter gelbe Flecken, nach 3—4 Stunden sind sie hellgrau und fertig extrahiert. Sie werden durch das Aceton nicht gehärtet wie in Alkohol, sondern aufgeweicht. Chlorophyllid läßt sich aus ihnen nicht isolieren, es befindet sich nur in der tiefgrünen Acetonlösung. Diese wird in der Zentrifuge von den Blättern getrennt, mit viel Talk (500—600 g) versetzt, der zum Sammeln der feinen und leichten Chlorophyllidkryställchen erforderlich ist, und portionenweise mit Wasser verdünnt, im ganzen mit dem doppelten Volumen. Währenddessen krystallisiert das Chlorophyllid in mikroskopischen Krystallen aus,

in regelmäßigen, sechseckigen Täfelchen. Vom Talk wird die Flüssigkeit so weit wie möglich dekantiert, dann wird er auf der Nutsche abgesaugt und in Vakuumexsiccatoren getrocknet; dies darf nicht zu langsam erfolgen, da das Präparat sonst verdirbt.

Der trockne Talk wird in etwa 4 Portionen verarbeitet. Man füllt ihn auf die Nutsche und wäscht ihn langsam mit viel Äther, der hauptsächlich gelbe und farblose Beimischungen entfernt. Wenn er schön hellgrün abläuft, so verdrängen wir ihn mit etwa 300 ccm Aceton, welches das Chlorophyllid äußerst leicht aufnimmt. Aus der Acetonlösung führen wir die Substanz durch Vermischen mit Wasser (bei den freien Chlorophylliden ist stets destilliertes Wasser anzuwenden, da sonst grüne Flocken das Calciumsalzes ausfallen) und Äther in den letzteren (2 l für jede Portion) über. Der Äther wird durch 8—10maliges Waschen ganz vom Aceton befreit und mit Natriumsulfat annähernd getrocknet. Die Lösungen müssen verdünnt gehalten werden, damit nicht während der Dauer der notwendigen Vornahmen die erwähnte Selbstzersetzung des Chlorophyllids erfolgt. In geringerer Konzentration ist die komplexe Verbindung beständiger, etwas braunen Niederschlag setzt sie indessen zumeist ab. Die ätherische Chlorophyllidlösung wird sehr rasch und sehr weit eingeengt, und zwar unterbrochen von wiederholtem Filtrieren, bis das Papier sich nicht mehr braun anfärbt. Endlich beim Eindampfen bis fast zur Trockne krystallisiert das Chlorophyllid aus in stets sechseckigen Blättchen, die prächtig glänzen und in der Aufsicht blauschwarze, in der Durchsicht grüne Farbe zeigen. Die Krystallisation tritt in etwas wasserhaltiger ätherischer Lösung leichter ein als in scharf getrockneter.

Die Ausbeute betrug 12 g, also 0,5 g für 1 kg frischer Blätter. Das Präparat gibt eine rein grüne ätherische Lösung, die von $n/_{100}$-KOH ganz entfärbt wird. Es ist also frei von gelben Substanzen sowie von Estern. Bei der Spaltungsprobe entstehen Phytochlorin e und Phytorhodin g im Verhältnis 3 : 1 und nichts Schwachbasisches.

Es ist leichter, das Chlorophyllid aus nur mäßig eingeengter ätherischer Lösung (200 ccm für jede Portion) durch langsamen Zusatz von leichtflüchtigem Petroläther (300 ccm) auszufällen; es

scheidet sich rasch als sehr feines krystallinisches Pulver von blaubis grünschwarzer Farbe aus, das unter dem Mikroskop nur die Form von kugeligen Aggregaten zeigt. Diese Form des Präparates ist aber weniger haltbar als die krystallisierte, in 4 Monaten war $^1/_3$ davon in Phäophorbidmagnesium verwandelt.

Hydrolyse von Methylchlorophyllid. Auch reiner Methylester läßt sich mit Hilfe von Chlorophyllase hydrolysieren, aber viel schwerer als Rohchlorophyll. Für diesen Versuch bereiteten wir das Enzym aus 50 g Mehl von Heracleumblättern durch wiederholtes gründliches Extrahieren mit 80prozentigem Aceton. Das entfärbte Mehl wurde mit 50 ccm Wasser verrührt und in die Lösung von 0,5 g Methylchlorophyllid b in 200 ccm reinem Aceton eingetragen. Die Lösung blieb nach Zusatz einer kleinen Menge Oxalsäure (0,02 g) und unter häufigem Umschütteln 4 Tage stehen, doch machte die Reaktion schon nach 2 Tagen keine Fortschritte mehr. Aus dem Reaktionsprodukt haben wir nach dem Überführen in Äther und Wegwaschen von Aceton das freie Chlorophyllid mit Hilfe von Ammoniak quantitativ isoliert, indem wir die ätherische Lösung mit einem Drittel ihres Volumens Petroläther vermischten und daraus durch Einleiten von gasförmigem Ammoniak das Salz auf Talk ausfällten. Durch Ausschütteln mit Äther und Wasser unter Zusatz von ein paar Tropfen Mononatriumphosphatlösung isolierten wir das freie Chlorophyllid b in einer Ausbeute von nur 0,05 g. Es zeigte die rote Phase und gab reines Phytorhodin g.

X. Isolierung der Komponenten a und b der Chlorophyllide.

Die verschiedenen Darstellungen der krystallisierten Chlorophyllide unterscheiden sich oft bei der Spaltungsprobe im Verhältnis von Chlorin zu Rhodin. Bei der Gewinnung von Methylchlorophyllid enthielt der Talkanteil vorherrschend Komponente a. Bei Verarbeitung gewisser Pflanzen z. B. Ulva lactuca, Aesculus hippocastanum, ist mehrmals überwiegend b-Methylchlorophyllid isoliert worden. Aber einheitlich trat dabei eine Komponente nicht auf.

Deshalb verzichtet man am besten für die Trennung der Komponenten auf die mehr zufällige Fraktionierung durch Krystallisation. Wir isolieren die reinen Verbindungen a und b aus den Chlorophyllidgemischen nach dem Prinzip der Entmischung von Stokes und von Kraus, aber wegen der besonderen Löslichkeitsverhältnisse der Chlorophyllide mit einem neuen System von Lösungsmitteln. Da die Verbindungen in Petroläther und Schwefelkohlenstoff unlöslich sind, nützt die Trennung einen Unterschied der Löslichkeiten in Äther aus; b ist darin schwerer löslich als a. Wir verteilen die Substanzen zwischen Äther und wasserhaltigem Holzgeist, wenden aber statt des noch mit stark wasserhaltigem Methylalkohol mischbaren Äthers ein Gemisch gleicher Volumina von Äther und Petroläther an. Die Komponenten b gehen hieraus leichter in den wasserhaltigen Holzgeist über. Methylchlorophyllid b wird daher mit 50- bis 60-, freies Chlorophyllid b mit 40- bis 50-prozentigem Holzgeist aus der Äther-Petrolätherlösung des Komponentengemisches extrahiert.

1. Trennung der Methylchlorophyllide[1]).

Für die Fraktionierung ist 60prozentiger Holzgeist am geeignetsten; damit geht aus der Äther-Petrolätherlösung besonders in die ersten Ausschüttelungen fast nur das Methylchlorophyllid b über. Noch verdünnterer Methylalkohol würde dem Äther zu wenig Substanz entziehen, konzentrierterer differenziert nicht so gut, er nimmt zuviel von der Komponente a zusammen mit b auf.

Die Reinheit der Präparate wird dadurch gefährdet, daß das Chlorophyll bei der Einwirkung von Alkoholen leicht Allomerisation erleidet. Um sie zu verhüten, arbeiten wir in allen methyl- und äthylalkoholischen oder wässerig-alkoholischen Lösungen mit einem kleinen Zusatz von Oxalsäure, nämlich $^1/_{1000}$%. Eine Zersetzung der Magnesiumverbindungen wird bei dieser Verdünnung der Säure nicht beobachtet.

Die Arbeitsweise bei der Trennung ist etwas verschieden, je nachdem das Gemisch ärmer oder reicher an b ist; wir führen deshalb 2 Beispiele an.

a) Trennung eines Gemisches von etwa $^3/_4$ a- und $^1/_4$ b-Komponente. Man kann mit einem Scheidetrichter von 7 l Inhalt 2 g des Ausgangsmaterials auf einmal in Arbeit nehmen und höchstens zwei solche Chargen an einem Tag bewältigen. Die anzuwendenden Lösungsmittel müssen rein sein; allen Kahlbaumschen Äther haben wir, um ihn von seinem Fettgehalt zu befreien, nochmals destilliert. Trotz der größeren Kosten ist es vorteilhaft, eine Petrolätherfraktion vom Siedepunkt 30—50° zu benutzen.

2 g Methylchlorophyllid nehmen wir, da es zu langwierig wäre, es in Äther oder in Holzgeist aufzulösen, in 0,3 l absolutem Äthylalkohol auf und vermischen die Lösung sofort im großen Scheidetrichter mit 2,8 l Äther. Dann wird der Äthylalkohol durch dreimaliges Ausschütteln mit je 1 l Wasser herausgewaschen, wobei das Volumen der ätherischen Schicht auf $2^1/_2$ l zurückgeht. Um die Ausfällung des Chlorophyllides durch Petroläther zu verhüten, setzt man nun 0,3 l Methylalkohol und dann erst unter Umschütteln

[1]) Ann. d. Chem. 387, 345 [1912].

$2^1/_2$ l niedrig siedenden Petroläther hinzu. Zum erstmaligen Ausschütteln werden 1 l 60prozentiger Methylalkohol, und da die Flüssigkeit schon 300 ccm Holzgeist enthielt, noch 200 ccm Wasser angewandt. Die methylalkoholische Schicht nimmt vom Farbstoff reichlich 5% auf, und zwar zu ungefähr 70% b und 30% a. Sie ist gelbgrün gefärbt, eine Probe gibt beim Überführen in Äther und Verseifen mit methylalkoholischer Kalilauge die braune Phase mit stark roter Nuance. Nach diesem ersten Entmischen wird das Volumen der ätherisch-petrolätherischen Schicht markiert und bei den folgenden elf Ausschüttelungen durch Zusatz von Äther allein konstant erhalten. Die zweite bis zwölfte Entmischung wird mit je 1 l 60prozentigem Holzgeist ausgeführt. Von da an wird ohne Ergänzung des Äthervolumens weiter mit 60prozentigem Methylalkohol ausgeschüttelt, gewöhnlich noch etwa fünfmal. Ob die Entfernung von b vollständig geworden ist, ob also schließlich nur Methylchlorophyllid a in die methylalkoholische Schicht übergeht, prüfen wir („Phasenprobe") etwa von der 15. Entmischung an wieder durch Überführen einer Probe aus der (nicht mehr gelbstichigen, sondern rein grünen) alkoholischen Lösung in Äther und Versetzen mit methylakoholischem Kali. Wenn die Farbe von Grün nicht mehr in Braun, sondern in reines Gelb umschlägt, so ist nur noch a vorhanden. Dann wird durch häufiges Ausschütteln mit sehr viel Wasser (oder Durchströmenlassen von Wasser durch den Scheidetrichter am Brunnen) der Methylaklohol vollständig und der Äther zum größten Teil weggewaschen. Dabei fällt infolge seiner Unlöslichkeit in Petroläther das Methylchlorophyllid a in stahlblauen, krystallinischen Flocken aus. Die wässerige Schicht wird abgelassen, dann wird die Flüssigkeit mit etwas geglühtem Natriumsulfat und ein wenig Talk (etwa 50 g), der die Flüssigkeit ganz entfärbt, versetzt und abfiltriert. Man wäscht mit Äther nach und extrahiert sofort (beim Aufbewahren in diesem Zustand leidet das Präparat) auf der Nutsche mit absolutem Alkohol, aus dem man das Chlorophyllid in Äther überführt (etwa $1^1/_2$ l). Die durch gründliches Auswaschen von Alkohol befreite ätherische Lösung wird nach dem Trocknen auf etwa 80 ccm eingeengt. Schon während des Abdampfens krystallisiert das Methylchlorophyllid a

in prächtigen, blau glänzenden Drusen rhombenförmiger Blättchen aus.

Die Ausbeute an a beträgt 0,6—0,7 g; die Substanz bedarf keiner weiteren Reinigung.

Zu gleicher Zeit soll man die methylalkoholischen Lösungen auf die Komponente b verarbeiten, und zwar die ersten 8 Auszüge. Sie werden paarweise miteinander vereinigt. Der 1. und 2. Auszug werden zusammen mit $^1/_2$ l Methylalkohol versetzt, so daß die Flüssigkeit aus etwa 65prozentigem Holzgeist besteht; ebenso verfahren wir bei Auszug 3 und 4, hingegen sind 5 und 6 und 7 und 8 in ihrer ursprünglichen Konzentration zu verwenden. Die 4 Paare von Auszügen werden einmal mit je 1 l und ein zweites Mal mit je $^1/_2$ l Petroläther-Äthergemisch (3 Volumen Petroläther und 1 Volumen Äther) ausgeschüttelt, um soweit als möglich die Komponente a zu entfernen. Die obere Schicht gibt bei der „Phasenprobe" eine ausgesprochen gelbe, die untere (nach Überführen der Substanz aus 5 ccm der holzgeistigen Lösung in Äther) eine rotbraune Phase mit methylalkoholischem Kali. Die vollständige Abtrennung von a in einem einzigen Verfahren hat sich bei dem an b armen Ausgangsmaterial nicht bewährt; dasselbe hat eine bessere Ausbeute an b geliefert, wenn wir zunächst auf ein 90% b enthaltendes Präparat hinarbeiten und dieses durch ein Verfahren der fraktionierten Fällung reinigten.

Zur Isolierung des rohen Methylchlorophyllids b werden die so gewaschenen methylalkoholischen Auszüge alle zusammen ausgeäthert; die ätherische Lösung befreien wir durch gründliches Waschen ganz vom Methylalkohol und engen sie auf $^1/_2$ l ein. Man läßt die Substanz aber nicht auskrystallisieren, durch Ausfällen kann man besser noch etwas a abtrennen. Die noch warme Ätherlösung wird zu diesem Zweck mit etwas Talk (etwa 30 g) und mit 300 ccm Petroläther versetzt; in der Mutterlauge bleibt fast nur etwas a-Komponente. Der Talk wird auf der Nutsche abfiltriert und so lange mit Äther nachgewaschen, bis dieser nur noch schwach gelbgrün gefärbt abläuft und beim Versetzen mit methylalkoholischem Kali einen schönen Farbumschlag in Braunrot zeigt.

Anfangs hat der Äther etwas Methylchlorophyllid a weggenommen. Aus dem Talk wird sogleich durch Extrahieren mit absolutem Alkohol, Überführen in Äther, Waschen und Einengen auf 50 ccm das Methylchlorophyllid isoliert, das man in einer Ausbeute von 0,25—0,3 g erhält. Es bildet eine schöne grünschwarze Krystallisation von metallischem Glanz; sie besteht aus etwa 90% der Komponente b und 10% a.

Reinigung des Methylchlorophyllids b. Die bei der Isolierung schon einmal angewandte fraktionierte Fällung wiederholen wir für die Reinigung noch dreimal.

Vom 90 prozentigen Methylchlorophyllid lösen wir 1 g in 600 ccm absolutem Alkohol und machen daraus eine ätherische Lösung durch Vermischen mit 4 l Äther und Herauswaschen des Alkohols, wofür sechsmaliges Ausschütteln mit je $1^1/_2$ l Wasser erforderlich ist. Die ätherische Lösung wird auf 600 ccm eingeengt und warm, noch ehe die Krystallisation beginnt, mit etwa 50 g Talk versetzt und mit 400 ccm Petroläther gefällt. Auf der Nutsche wäscht man den abgesaugten Talk gründlich mit Äther aus; dabei wird etwas b verloren, aber namentlich a entfernt. Dann extrahieren wir den Talk sofort auf der Nutsche mit absolutem Alkohol (etwa $^1/_2$ l), um aufs neue den Farbstoff in Äther überzuführen und wieder unter Zusatz von Talk durch Petroläther abzuscheiden. Dieselbe fraktionierte Ausfällung führen wir noch ein drittes Mal aus. Die beiden ersten ätherisch-petrolätherischen Mutterlaugen waren nach dem Abfiltrieren vom Talk blaugrün und enthielten die Komponente a; die dritte Mutterlauge hingegen war schwach gefärbt, und zwar gelbgrün. Aus der zum viertenmal bereiteten ätherischen Lösung wird durch Einengen das vollkommen reine Methylchlorophyllid b als wunderschöne dunkelgrüne Krystallisation erhalten; sie ist einheitlich und besteht aus metallglänzenden rhombenförmigen Blättchen; die Mutterlauge ist ganz hell. Die Ausbeute betrug 0,5—0,6 g, also wenig mehr als die Hälfte des angewandten 90-prozentigen Präparates. Auch bei niedriger prozentigen Rohprodukten von Methylchlorophyllid b (70—80 prozentig) hat die wiederholte (hier fünfmalige) fraktionierte Ausfällung ein ebenso gutes Resultat ergeben.

b) Trennung eines Gemisches von etwa 60% Methylchlorophyllid a und 40% b. Wenn das Ausgangsmaterial an b reicher ist, so ist es leicht möglich, in einem Prozesse zu einem nahezu reinen Präparat von b zu kommen (95—98prozentig). Man kann dann eine größere Anzahl der methylalkoholischen Auszüge verwenden, und sie werden so viel reicher an b, daß sie sich schon durch Ausschütteln mit Äther-Petroläther und einmaliges Ausfällen genügend von a befreien lassen.

2 g Methylchlorophyllid werden auf dem Umweg über die alkoholische Lösung in Äther gebracht. Die erste Entmischung bewirken wir mit 0,6 l Holzgeist, 2,5 l Petroläther und 0,4 l Wasser, alle folgenden Entmischungen mit je 1 l 60prozentigem Holzgeist; das Volumen der ätherisch-petrolätherischen Schicht wird bis gegen das Ende der Fraktionierung konstant gehalten. Die 12 ersten Auszüge verarbeiten wir paarweise. Man bringt die 2 ersten Paare wieder auf höhere Konzentration (65%) durch Zufügen von $^1/_2$ l Methylalkohol, die Auszüge 5 und 6 vermischen wir nur mit 0,3 l, 7 und 8 mit 100 ccm Methylalkohol, den folgenden lassen wir ihre ursprüngliche Konzentration. Die Auszüge werden dann nur ein einziges Mal mit je 1 l Petroläther-Äther 3 : 1 gewaschen; das in den Holzgeist mitgegangene a geht, wie man an der Farbe und dem Farbumschlag mit methylalkoholischem Kali sieht, recht vollständig wieder heraus. Nach den ersten 12 methylalkoholischen Auszügen ist die weitere Verarbeitung auf b nicht mehr lohnend. Das Methylchlorophyllid b wird aus dem wässerigen Holzgeist in Äther übergeführt und, wie in a) beschrieben, einmal aus konzentrierter ätherischer Lösung mit Petroläther fraktioniert ausgefällt, dann wieder gelöst und zur Krystallisation gebracht.

Für die Reinigung der Komponente a ist es erforderlich, mit dem Auswaschen durch 60prozentigen Holzgeist noch weitere 6 bis 10mal fortzufahren. Schließlich läßt sich in den Auszügen gar kein b mehr nachweisen. Das Methylchlorophyllid a wird, wie oben angegeben, mit Hilfe von Talk isoliert und dann aus ätherischer Lösung krystallisiert erhalten.

Die Ausbeute und der Reinheitsgrad von a hängen von der Zahl der Ausschüttelungen ab. Bei der Verarbeitung von 100 g

Methylchlorophyllidgemisch erhielten wir aus je 2 g meistens 0,65 g gut 95prozentiges oder 0,5 g reines Methylchlorophyllid a und daneben 0,45—0,55 g Methylchlorophyllid b.

2. Trennung der freien Chlorophyllide[1]).

Die freien Carbonsäuren werden mit verdünnterem Methylalkohol getrennt als die Methylverbindungen.

Da sie sich noch viel leichter allomerisieren als ihre Methyl- und Äthylester — es genügt für diese Umwandlung, sie nur in Alkohol aufzulösen —, so ist bei ihrer Isolierung der Zusatz von 0,001% Oxalsäure besonders wichtig. Außerdem erfolgt bei den sauren Chlorophylliden sehr leicht Selbstzersetzung unter Austritt von Magnesium; deshalb sind alle Operationen in größter Eile auszuführen.

2 g krystallisiertes Chlorophyllidgemisch werden in Aceton gelöst und in 3 l Äther eingegossen; das Aceton entfernen wir größtenteils durch dreimaliges Ausschütteln mit Wasser. Dann vermischt man die Ätherlösung mit $^1/_2$ l Methylalkohol und 2 l Petroläther (Siedepunkt 30—50°) und entmischt sie durch Zusatz eines halben Liters Wasser. Nach kräftigem Durchschütteln lassen wir die gelbgrüne, verdünnt-holzgeistige Schicht, welche überwiegend die Komponente b enthält, aus dem Scheidetrichter in einen zweiten abfließen, der mit Äther beschickt ist. Durch Verdünnen mit Wasser wird hier eine ätherische Lösung von rohem Chlorophyllid b gewonnen.

Jetzt wird das Volumen der zurückgebliebenen Äther-Petrolätherschicht markiert und von nun an durch Auffüllen von Äther nach jeder Entmischung konstant erhalten. Noch 2 weitere Auszüge mit je 1 l 50prozentigem Holzgeist enthalten so viel von der Komponente b, daß sie in derselben Weise in Äther übergeführt und mit dem ersten Auszug gemeinsam verarbeitet werden. Die gewaschene ätherische Lösung wird auf 300 ccm eingeengt und mit 600 ccm Petroläther auf Talk gefällt. Nach Waschen mit Petroläther und wenig Äther extrahiert man erschöpfend mit Äther auf

[1]) Ann. d. Chem. 387, 362 [1912].

der Nutsche und fällt aus der eingedampften Lösung mit viel Petroläther 0,25—0,3 g Chlorophyllid mit einem Gehalt von $^2/_3$—$^3/_4$ b aus.

Zu gleicher Zeit mit der Verarbeitung der ersten 3 methylalkoholischen Auszüge auf b ist die Reinigung der im Äther-Petroläther angereicherten Komponente a fortzusetzen. Wir schütteln weitere fünf Mal aus mit je 1 l 50prozentigem Holzgeist unter Ergänzung der oberen Schicht mit Äther und endlich viermal ohne Nachfüllen von Äther. Die ätherisch-petrolätherische Lösung, die anfangs rein grün gewesen, hat jetzt blaugrüne Farbe und sogar fast blaue, wenn man aus einer Probe den Alkohol herauswäscht. Mit der Phasenprobe kann man bei den freien Chlorophylliden das Ende der Fraktionierung nicht gut erkennen. Schließlich wird aus der petrolätherischen Schicht noch durch Waschen mit destilliertem Wasser der Methylalkohol und so viel Äther herausgelöst, bis das Chlorophyllid an den Wänden des Scheidetrichters auszukrystallisieren beginnt. Die Abscheidung vervollständigt man im gleichen Gefäß durch Zusatz von noch 1 l Petroläther sowie von etwas Natriumsulfat und etwa 100 g Talk. Auf der Nutsche waschen wir den Talk zuerst mit Petroläther, dann, um ihn zu verdrängen, mit etwas Äther und extrahieren sogleich mit mehr Äther. Die erhaltene Lösung wird auf einige 100 ccm eingeengt und filtriert, dann bis auf 100 ccm abgedampft und durch langsames Eintragen von 400 ccm Petroläther gefällt. Die Abscheidung (0,55—0,6 g) bildet ein matt-blauschwarzes Pulver, das unter dem Mikroskop krystallische Struktur zeigt und öfters aus gerundeten Blättchen besteht. Sie enthielt bei 5 Versuchen die reine Komponente a ohne eine Beimengung von b, bei einem Versuche, wo die Zahl der Ausschüttelungen mit Holzgeist vermindert worden, mit einem Gehalt einiger Prozente von b.

Die Reinigung der Komponente b besteht in einer Wiederholung des Entmischungsverfahrens. 0,45 g eines b-reichen, z. B. 75prozentigen Präparates werden mit 100 ccm Methylalkohol in 1 l Äther aufgelöst und mit 600 ccm Petroläther vermischt. Zur Entmischung schüttelten wir mit 100 ccm Wasser und weiteren 500 ccm 40prozentigem Holzgeist durch. Die verdünnt alkoholische

Schicht war stark gelbgrün gefärbt, sie wurde abgelassen, und zwar direkt in Äther hinein, in den wir die Substanz durch Zusatz von Wasser vollständig überführten. Dann schüttelten wir den Äther-Petroläther noch ein zweites bis viertes Mal mit je $^1/_2$ l 40prozentigem Holzgeist durch und ergänzten das Volumen der oberen Schicht immer wieder mit Äther. Diese 3 holzgeistigen Auszüge sind ebenfalls ausgeäthert und alle Ätherlösungen des Chlorophyllids b zusammen verwendet worden. Man wäscht möglichst rasch den Methylalkohol heraus, dampft auf 300 ccm ein und fällt die Substanz nochmals mit 600 ccm Petroläther auf Talk. Aus diesem läßt sie sich auf der Nutsche mit 1 l Äther extrahieren. Durch Einengen auf 50 ccm und langsames Vermischen mit Petroläther wurde endlich die reine Carbonsäure in einer Ausbeute von 0,15 g als dunkelgrüne mikrokrystallinische Fällung ausgeschieden. In diesem Präparat ließ sich durch die Spaltungsprobe kein Phytochlorin e mehr nachweisen.

XI. Beschreibung der Chlorophyllide.

1. Krystallisiertes Chlorophyll[1]).

Krystallisiertes Chlorophyll ist das Gemisch der Äthylchlorophyllide a und b. Sie bilden in wechselndem Verhältnis Mischkrystalle, werden aber zumeist in dem üblichen Komponentenverhältnis a : b = 2,5 : 1 erhalten. Je nach dem Gehalt der beiden Komponenten variieren einige Eigenschaften, namentlich die optischen.

Die Substanz zeigt sämtliche Merkmale und Reaktionen des natürlichen Pigmentes, abgesehen von den Eigentümlichkeiten, welche auf dessen Phytolgehalt beruhen. Der Ersatz der Phytolgruppe durch den Äthylrest bewirkt das große Krystallisationsvermögen und die erwünschte Verminderung der Löslichkeit in verschiedenen Solvenzien.

Das Molekül ist durch die Änderung der Estergruppe um 28% verkleinert, nämlich von 906,6, dem wahrscheinlichen Durchschnittswert für das normale Gemisch, auf 654,6; für die Untersuchung des Phytochromins ist das Äthylchlorophyllid daher als unverändertes, gewissermaßen 139prozentiges Chlorophyll zu betrachten. Es ist nämlich 1 g Chlorophyll farbäquivalent 0,72 g krystallisiertem Chlorophyll.

Das krystallisierte Chlorophyll bildet meistens scharf begrenzte, gleichseitig sechseckige und dreieckige Täfelchen (Tafel II, Fig. 1 und 2).

Aus den Dreiecken gehen mitunter durch Abstumpfung der Winkel ungleichseitige Sechsecke hervor. Außer diesen typischen

---

[1]) Ann. d. Chem. 358, 277 [1907] und Ann. d. Chem. 382, 151 [1911].

Formen treten auch keilförmige und stumpflanzettförmige Prismen auf. Manchmal beobachtet man sehr stumpfe Flächen eines vicinalen Rhomboeders, dessen Kanten senkrecht zu 3 Seitenkanten der Sechsecke stehen. Wahrscheinlich liegt das hexagonale System in einer trigonalen Hemiedrie vor. Der Durchmesser der Krystalle beträgt gewöhnlich 0,1—0,2 mm.

Das Krystallmehl ist blauschwarz und zeichnet sich durch lebhaften metallischen Glanz aus, namentlich im Sonnenlicht zeigt es wunderbare Reflexe. Die Pulverfarbe ist dunkelgrün. In der Durchsicht erscheinen die Täfelchen bald mehr blaugrün, bald gelbgrün.

Beim Erhitzen zersetzt sich die Substanz, ohne einen Schmelzpunkt zu zeigen, unter Aufblähen und Entwicklung von Dämpfen, die den salzsäuregetränkten Fichtenspahn etwas röten; sie bildet schwer verbrennliche Kohle und hinterläßt schließlich rein weiße Magnesia.

Das übliche Äthylchlorophyllidgemisch ist leicht löslich in absolutem Alkohol, Holzgeist und Aceton, unlöslich in Petroläther, ziemlich schwer löslich in Äther, b-reiches Gemisch sogar recht schwer in diesem (1 g in 2,5 l). Die ätherische Lösung ist blaugrün, die alkoholische viel gelbstichiger grün. Chloroform löst namentlich in der Wärme reichlich, Benzol beim Sieden ziemlich leicht, kalt schwer, Methylal beim Kochen leicht, aber nur wenig schwerer in der Kälte. Für die Bestätigung des Molekulargewichts[1]) nach der kryoskopischen Methode war Veratrol ein geeignetes Lösungsmittel. Aus Methylal, ferner aus Äther, namentlich durch Überführen in diesen mit etwas Oxalsäure enthaltendem Alkohol läßt sich das Chlorophyllid schön umkrystallisieren, besonders schön aus 90prozentigem Alkohol, worin eine Spur Oxalsäure gelöst ist.

Ohne diesen Zusatz erleidet Äthylchlorophyll in Alkohol oder Holzgeist in höchstens einigen Stunden vollständig die Allomerisation und wird dadurch unkrystallisierbar und leicht löslich in Äther; dann fehlt ihm die braune Phase.

---

[1]) Ann. d. Chem. 382, 155 [1911].

Beim Erhitzen mit konzentrierter Salpetersäure liefert das Chlorophyllid eine hellgelbe Lösung ohne Ausscheidung von Öl; dies ist unterscheidend gegenüber der Phytylverbindung.

Äthylchlorophyllid ist indifferent, es hat weder saure noch basische Eigenschaften. 20prozentige Salzsäure löst die feste Substanz nicht, doch geht der Farbstoff aus seiner ätherischen Lösung unter Verlust des Magnesiums in 20prozentige Salzsäure zum großen Teil, in 22prozentige quantitativ über. Durch diese Basizitätsprobe unterscheidet sich das einfache Chlorophyllid besonders scharf vom Chlorophyll.

Bei der Spaltung mit Säure entsteht das Gemisch von a- und b-Äthylphäophorbid, das sich aus Äther in zwei nach Löslichkeit, Farbe und Krystallform recht verschiedenen Fraktionen ausscheidet; zunächst kommt eine an der Komponente b reiche Krystallisation in schwarz glänzenden rhombenförmigen Täfelchen, dann eine überwiegend aus der Komponente a bestehende in rötlich-violettgrauen langen Nadeln zur Abscheidung.

2. Zur Methode der Analyse hochmolekularer Verbindungen.

Das im Vakuum der Wasserstrahlpumpe im Phosphorpentoxydexsiccator getrocknete (Gewichtsverlust $1^1/_4\%$) Äthylchlorophyllid entsprach der Formel:

$$C_{38}H_{44}O_7N_4Mg,$$

aber das Analysenergebnis war irreführend. Die Substanz erfuhr nämlich unter 0,001—0,01 mm Druck bei 105° einen weiteren Gewichtsverlust von 5% und stimmte danach für die Formel:

$$C_{37}H_{39}O_{5\frac{1}{2}}N_4Mg.$$

Für die Klarlegung der zwischen den Gliedern einer so komplizierten Gruppe bestehenden Beziehungen ist eine solche Differenz von einem Atom Kohlenstoff von großer Bedeutung. Die zweite Formel soll ausdrücken, daß das Chlorophyllid sich zusammensetzt aus:

1. Chlorophyllid a $C_{37}H_{39}O_{5\frac{1}{2}}N_4Mg$,
2. Chlorophyllid b $C_{37}H_{37}O_{6\frac{1}{2}}N_4Mg$.

Da die Menge von a und b sich ungefähr verhält wie 2,5 : 1, so beeinflußt die Beimischung von b sehr wenig die Zusammensetzung des Präparates. Jede der beiden Komponenten betrachten wir als bestehend aus ungefähr gleichen Teilen von Lactam und Lactamhydrat, wahrscheinlich verbunden zu Halbhydrat.

Trotz der Größe des Moleküls ist aus der Elementaranalyse mit Wahrscheinlichkeit auf eine Kohlenstoffdifferenz in den beiden Trockenzuständen zu schließen. Auch zeigte sich der Kohlenstoff der heiß getrockneten Substanz nicht in dem Maße erhöht, wie es nach Abgabe von Wasser der Fall sein müßte. Daher ist nicht allein

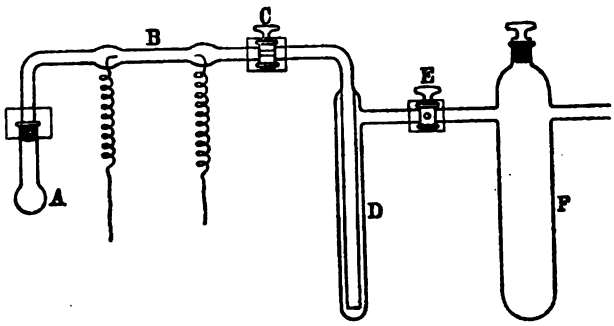


Fig. 9.

Wasser, sondern zugleich eine Kohlenstoffverbindung abgegeben worden. Die Prüfung ergab, daß es sich weder um Formaldehyd, woran man hätte denken können, noch Kohlensäure, auch nicht Methyl- oder Äthylalkohol handelt, sondern daß außer Wasser (nur mit einer Spur von Alkohol) Äther entweicht.

Das Trocknungskölbchen A (Fig. 9) ist durch eine Entladungsröhre B mit der Kondensationsvorlage D und einem Gefäß für Tierkohle F und der Hochvakuumpumpe verbunden. Die Verbindungen sind kurz und weit; der Schliff des Trocknungskölbchens und die Hähne, welche 5 mm Bohrung haben, sind durch Einbetten in Paraffin gedichtet. Wenn das Vakuum hergestellt ist, schließen wir die Verbindung mit der Pumpe ab und verbessern das Vakuum durch Kühlen der Tierkohle mit flüssiger Luft, so daß die elektrischen Entladungen zum Verschwinden kommen. Dann wird der Hahn E geschlossen und die Konden-

sationsvorlage in flüssige Luft gestellt. Für die Trocknung steht das Kölbchen in einem im Luftraum mit Eisenfeile gefüllten V. Meyerschen Toluolbad; sie erfordert 6—8 Stunden. Dann wird der Hahn C geschlossen, die Verbindungen zwischen A und C und zwischen E und F aufgeschnitten und die Kondensationsvorlage z. B. in die Verbrennungsröhre eingesetzt.

Die Kondensate zeigten das Atomverhältnis

1. 1 C : 7,45 H : 2,65 O,
2. 1 C : 6,51 H : 2,37 O.

Wir finden also etwas mehr Wasser und etwas weniger Äther (2% vom Gewicht des Chlorophyllids an Äthyläther), als der Abgabe von:

$$1^1/_4 \text{ Mol. } H_2O \text{ und } ^1/_4 \text{ Mol. Äther}$$

entspricht.

Das Kondensat ist nicht Alkohol. Es gibt nämlich mit Benzoylchloriden keine Ester; aber beim Erhitzen mit Jodwasserstoffsäure bildet es Jodäthyl.

Auch bei vielen anderen Chlorophyllderivaten ist die Vakuumtrocknung von Wichtigkeit für die Analyse, besonders wegen der festen Bindung des Äthers. Die Ätherate namentlich der magnesiumhaltigen Verbindungen, der Phylline, verhalten sich bei der Trocknung den Grignardschen Magnesiumverbindungen[1]) ähnlich, nicht so sehr die Rohprodukte, als die aus Äther umkrystallisierten Präparate. Glaukophyllin und Rhodophyllin krystallisieren mit einem Gehalt von 14, Pyrrophyllin mit 11% Äther. Er ist darin so fest gebunden, daß man 3—5 Monate im Vakuum der Wasserstrahlpumpe auf 140—150° erhitzen muß, um ihn zu verjagen; dabei können die empfindlichen Substanzen Zersetzung erleiden.

In den meisten Fällen wird die Trocknung oder Abgabe von Äther durch Anwendung niedriger Drucke sehr erleichtert und es genügt dabei Erhitzen im Toluolbad; Ausnahmen bilden einige der erwähnten Phylline, bei denen auch das Hochvakuum keine besondere Beschleunigung bewirkte.

---

[1]) Vgl. z. B. E. E. Blaise, Compt. rend. 132, 839 [1901].

Für die Vorbereitung zur Analyse hat uns jahrelang die von Rhedensche Quecksilberpumpe gedient mit einem Vakuum von 0,001—0,03 mm. Wir bedienen uns jetzt statt dessen eines in bezug auf Saugwirkung und erreichbares Vakuum überlegenen Pumpenaggregates von Leybold Nachfolger, das sich aus der Gädeschen Quecksilberpumpe und einer rotierenden Kapselpumpe zusammensetzt. Es empfiehlt sich, zwischen Substanz und Quecksilberpumpe eine Röhre mit Goldblatt einzuschalten, wenigstens wenn flüchtige Bestandteile kondensiert werden sollen. Die meisten wasser- und ätherhaltigen Verbindungen werden beim Erhitzen an dieser Pumpe in einigen Stunden oder mindestens in einigen Tagen gewichtskonstant.

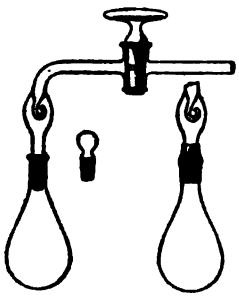


Fig. 10.
Trockenkölbchen.

Nach dieser Trocknung sind die Substanzen oft sehr hygroskopisch. Für die Elementaranalyse wägen wir sie daher nie offen ab, sondern durch Differenzwägung des Trocknungskölbchens. Die Birnenform desselben (Fig. 10) ist dafür wichtig, daß sich die Substanz ohne Verlust in das Schiffchen ausschütten läßt. Zu berücksichtigen ist noch die unvermeidliche Anziehung von Feuchtigkeit. In der Zeit bis zum Einführen in das Verbrennungsrohr werden gewöhnlich 2—3 mg Wasser von der Substanz im Schiffchen aufgenommen; dies wird bestimmt und von dem bei der Verbrennung gefundenen Wasser abgezogen.

Auch bei der Analyse anderer hochmolekularer Verbindungen sind diese Erfahrungen zu beachten und es empfiehlt sich, ähnlich wie bei dem krystallisierten Chlorophyll und bei den Phyllinen die Zusammensetzung der beim Trocknen verflüchtigten Bestandteile durch Kondensation zu untersuchen. Im Hinblick auf die allgemeine Bedeutung der Methode führen wir noch ein neues Beispiel an, die Analyse einer metallfreien Verbindung der Hämingruppe.

Durch Einwirkung flüssigen Chlorwasserstoffs haben Willstätter und M. Fischer Hämin enteisent (siehe Kap. XXIV, Abschn. 2); das gebildete Chlorid liefert in heißer Eisessiglösung beim Behandeln mit Natriumacetat und Ausfällen mit Wasser eine neue

Verbindung der Hämatoporphyringruppe[1]). Die Zusammensetzung der exsiccatortrocknen Substanz war genau gleich der von Hämatoporphyrin nach den Analysen von Nencki und Sieber[2]) und nach unseren Bestimmungen; daher schien ihr auch eine Formel mit 6 Sauerstoffatomen zuzukommen, wahrscheinlich $C_{32}H_{38}O_6N_4$.

Gefunden	Berechnet für $C_{32}H_{38}O_6N_4$
C 66,93	67,54
H 6,47	6,53

Hämatoporphyrin nach Nencki und Sieber (im Mittel)

66,89
6,35

Nach der Trocknung im Vakuum der Gädepumpe bei 105° enthielt nun das Präparat nur 4 Atome Sauerstoff.

Gefunden	Berechnet für $C_{32}H_{34}O_4N_4$
C 71,70	71,96
H 6,48	6,23

Das Ergebnis der Analyse deutete auf eine Abspaltung von 2 Molen Wasser hin. Der Trockenverlust betrug aber nicht, wie sich hierfür berechnet, 6,1%, sondern das Doppelte. Es ist also eine Kohlenstoffverbindung abgespalten worden.

2,4 g verloren 0,26 g. In einer mit flüssiger Luft gekühlten Vorlage (einem Reagierglas mit eingeführtem Glasrohr und seitlichem Ansatz) wurden die Dämpfe verdichtet. Das Kondensat enthielt 0,21 g Essigsäure.

Das Präparat hat bei der Trocknung 1 Mol. Essigsäure und 1 Mol. Wasser abgegeben; die Zusammensetzung der exsiccatortrocknen Substanz ist also:

$C_{35}H_{40}O_7N_4$, wofür sich berechnet: C 66,84, H 6,42.

3. Bestimmung der Methyl- und Äthylgruppe nebeneinander.

Grundlegend für die Kenntnis der Chlorophyllase und des krystallisierten Chlorophylls war die Auffindung der darin ent-

[1]) Unveröffentlicht.
[2]) Nencki, Opera II, 79.

haltenen Methyl- und Äthylgruppe. Die Untersuchung war anfangs durch einen Fehler in der Methodik irregeleitet. Bei der Methoxylbestimmung nach Zeisel gab das krystallisierte Chlorophyll Werte, die 2 Methylen entsprachen; das Jodmethyl wurde überdies nach der Angabe von F. Feist[1]) in der Form von Trimethylphenylammoniumjodid identifiziert mit Hilfe einer alkoholischen Lösung von Dimethylanilin. Um aber das Jodalphyl mit der aromatischen Base zu bestimmen, darf man nicht eine alkoholische Lösung derselben anwenden, da Jodäthyl fast gar nicht darauf einwirkt. Für den Nachweis von Äthyl war das Verfahren nicht erprobt. Das Jodmethyl findet man damit, das Jodäthyl übersieht man dabei. Hingegen eignet sich für den Nachweis beider unverdünntes Dimethylanilin, noch besser eine Trimethylaminlösung, z. B. eine zehnprozentige alkoholische Lösung.

Mit diesem Mittel wurde erkannt, daß Äthylchlorophyllid, im Hochvakuum heiß getrocknet, beim Erhitzen mit Jodwasserstoffsäure Jodmethyl und Jodäthyl in molekularem Verhältnis abspaltet.

Die Bestimmung eines Gemisches beider Jodalphyle[2]) beruht auf folgenden Beobachtungen über die Ausbeuten an quaternären Ammoniumsalzen aus denselben mit Dimethylanilin und Trimethylamin; 0,5 g Jodalkyl wurden mit je 10 ccm Dimethylanilin und mit je 10 ccm 10prozentiger Lösung von Dimethylanilin und Trimethylamin bei 20° angesetzt.

Stunden	Mit Jodmethyl			Mit Jodäthyl		
	1	6	24	1	6	24
Dimethylanilin in Alkohol	4	26	64	0	0	4
Dimethylanilin unverdünnt	46	95	100	1	8	31
Trimethylamin in Alkohol	98	99	99	9	77	90

1. Bei Anwendung von Dimethylanilin kann man die Trennung der Jodide ganz gut auf die verschiedene Reaktionsgeschwindigkeit der Alphyljodide gründen oder auf die verschiedene Löslichkeit der quaternären Jodide, namentlich in Chloroform.

[1]) Ber. d. d. chem. Ges. 33, 2094 [1900].
[2]) Ann. d. Chem. 382, 148 [1911].

Trimethylphenylammoniumjodid (Schmelzpunkt 212°) ist in Chloroform in der Kälte sehr schwer, beim Kochen schwer löslich, in warmem Aceton und in kaltem Alkohol ziemlich schwer löslich.

Dimethyläthylphenylammoniumjodid (Schmelzpunkt 136°), finden wir in Chloroform spielend löslich, in warmem Aceton recht leicht, in Alkohol kalt leicht löslich.

2. Mit Trimethylamin ist die Trennung schärfer und leichter auf Grund folgender Löslichkeitsbestimmungen auszuführen.

	Tetramethyl-ammoniumjodid	Trimethyläthyl-ammoniumjodid
Wasser	schwer löslich	äußerst leicht löslich
Aceton, Chloroform	spurenweise löslich	beträchtlich löslich
Absol. Alkohol	sehr schwer löslich, heiß 1 g in 1060 g	kalt leicht löslich, heiß 1 g in 1,23 g

Besonders geeignet ist absoluter Alkohol für die quantitative Trennung.

Beispiel: 1,18 g krystallisiertes Chlorophyll lieferten 0,60 g Jodidgemisch. Die Trennung ergab: 1. 0,29 g reines Tetramethylammoniumjodid, 2. 0,02 g Gemisch, 3. 0,23 g Trimethyläthylammoniumjodid.

Die Methode füllt wohl eine Lücke aus; sie eignet sich allgemein zur Bestimmung von Methyl- und Äthylalkohol nebeneinander.

4. Die Methylchlorophyllide a und b[1]).

Methylchlorophyllid a,

$$[C_{32}H_{30}ON_4Mg](COOCH_3)_2 + {}^1/_2\,H_2O,$$

krystallisiert (Tafel II, Fig. 3) in scharf begrenzten, rhombenförmigen Blättchen, die sich meist zu Drusen vereinigen, auch häufig in vorwiegend prismatisch ausgebildeten Krystallen. In der Durchsicht unter dem Mikroskop sind dünne Krystalle grün, dickere blaugrün; das Pulver ist blauschwarz. Das Präparat ist luftbeständig und in krystallisiertem Zustande beliebig haltbar.

[1]) Ann. d. Chem. 387, 351 und 355 [1912].

Die Komponente a löst sich in Alkohol sehr leicht mit grüner Farbe und blutroter Fluorescenz, in trockenem Äther schwer, nämlich 1 g exsiccatortrocken bei 19° in 760 ccm, in wasserhaltigem träger als in wasserfreiem. Die Farbe in Äther ist blaugrün, viel blauer als in den Alkoholen. In Aceton ist das Methylchlorophyllid a leicht löslich, in Benzol und Schwefelkohlenstoff nur ganz wenig, in Petroläther unlöslich, spielend löslich in Pyridin.

Zum Umkrystallisieren lösen wir Methylchlorophyllid gepulvert in absolutem Alkohol und bringen es daraus in Äther. Schichtet man den alkoholhaltigen Äther über Wasser, so krystallisiert ein Teil der Substanz allmählich aus. Bei größeren Mengen engt man die ätherische Lösung nach dem gründlichen Herauswaschen des Alkohols ein; entsteht dabei etwas Allomerisationsprodukt, so hinterbleibt es vollständig in der ätherischen Mutterlauge.

Das Methylchlorophyllid a ist chemisch indifferent, es nimmt kein Ammoniakgas auf. Gegen Säure ist es empfindlich, die verdünnte ätherische Lösung schlägt beim Schütteln mit 5prozentiger Salzsäure langsam, mit 10prozentiger rasch in Braun um.

Methylchlorophyllid b,

$$[C_{32}H_{28}O_2N_4Mg](COOCH_3)_2 + {}^1/_2\,H_2O),$$

krystallisiert in scharf begrenzten rhombenförmigen Täfelchen (Tafel II, Fig. 4) von ähnlicher Form, aber anderer Farbe wie a. Die Krystalle sind grünschwarz in der Aufsicht und unter dem Mikroskop in durchfallendem Licht gelb, olivgrün und olivbraun, je nach der Dicke. Das Pulver ist grünschwarz. Sogar bei Gemischen der beiden Chlorophyllide läßt sich der Gehalt an den Komponenten schätzen; je mehr a sie enthalten, desto mehr tritt die blaue Farbe auf, beim Überwiegen von b die dunkelgrüne.

Die Löslichkeit von Methylchlorophyllid b ist geringer, namentlich in Äther. Es löst sich darin sehr schwer, nur 1 g in 2,8 l bei 19°. Auch in Benzol ist es schwer löslich. In absolutem Alkohol löst sich die Substanz sehr leicht mit gelbgrüner Farbe und bräunlich roter Fluorescenz, während die Ätherlösung rein grün ist.

Bei der Phasenprobe mit der ätherischen Lösung erfolgt im ersten Augenblick Umschlag in schönes Rot; braunrot ist sie nur,

wenn a beigemischt ist, trübe braun oder rotbraun, wenn die Substanz durch die Wirkung von Alkohol gelitten hat. Die rote Phase geht bald in Braunrot und dann, allerdings viel langsamer als bei a, in Gelbgrün über. Methylchlorophyllid a gibt hingegen bei der Probe einen Farbumschlag in reines Gelb. In alkoholischer Lösung, namentlich in wasserhaltiger, geht die Phase viel rascher vorüber.

Gegen Säure ist das b-Chlorophyllid etwas beständiger als a; die ätherische Lösung behält beim Schütteln mit 10 prozentiger Salzsäure einige Zeit ihre Farbe, erst mit 15 prozentiger Säure wird das Magnesium rasch abgespalten.

5. Die beiden freien Chlorophyllide[1]).

Das Chlorophyllid a, $[C_{32}H_{30}ON_4Mg](COOH)(COOCH_3) + {}^1/_2 H_2O$, läßt sich aus wasserhaltigem Äther umkrystallisieren oder aus Aceton durch Zusatz von Wasser in krystallisierter Form ausfällen. Man begegnet nur einer Krystallform, sechsseitigen Täfelchen, die metallglänzend blauschwarz in der Aufsicht, im durchfallenden Licht grün bis blaugrün sind. In ätherischer Lösung ist die Farbe von freiem Chlorophyllid a noch blauer als die der Methylverbindung, die alkoholische Lösung hingegen ist rein grün, die Fluorescenz ist dunkelrot.

In absolutem Alkohol und Aceton löst sich die Säure spielend leicht, langsam, aber doch noch sehr leicht in 96 prozentigem Alkohol, ziemlich schwer in Äther (die krystallisierte Substanz, leichter die gefällte), dagegen ist sie unlöslich in kaltem Benzol und Petroläther.

Ein freies Carboxyl genügt, um das Chlorophyllid derart sauer zu machen, daß es aus ätherischer Lösung (0,02 g in 100 ccm) reichlich in $n/_{1000}$-KOH übergeht; $n/_{2000}$-KOH entzieht dem Äther nur wenig von der Säure; $n/_{4000}$ nimmt nichts auf. Zwischen $n/_{100}$-Na_2CO_3 und Äther verteilt sich die Substanz, $n/_{1000}$-Soda löst nur ganz wenig. Natriumbicarbonat (5 prozentig) entzieht die Carbonsäure dem Äther nicht. Ammoniak ($n/_2$) extrahiert aus

[1]) Ann. d. Chem. 387, 366 [1912].

dem Äther das Chlorophyllid vollständig, $n/_{20}$ reichlich, $n/_{200}$ noch deutlich.

Mit der Salzbildung durch Ammoniak läßt sich das Chlorophyllid von den Alkylchlorophylliden bequem trennen; beim Einleiten von Ammoniakgas in die trockene ätherische Lösung schlägt die Farbe in Grün um, dann trübt sich die Flüssigkeit und das Ammoniumsalz wird niedergeschlagen, am bequemsten auf Talk. Schüttelt man ihn nach dem Abfiltrieren mit Äther und Wasser, so geht infolge der Dissoziation des Salzes das freie Chlorophyllid in Äther; es ist unversehrt und rein.

Bei längerem Aufbewahren, besonders bei langdauerndem Erwärmen im Vakuum sowie beim langen Stehen selbst verdünnter Lösungen zersetzt sich das Chlorophyllid, es bildet ätherunlösliches Phäophorbidmagnesium.

Das Chlorophyllid b $[C_{32}H_{28}O_5N_4Mg](COOH)(COOCH_3)$ krystallisiert selbst bei großer Konzentration schwierig, es zersetzt sich leicht beim Einengen seiner ätherischen Lösung. Aus Aceton kommt es beim Abdunsten oder langsamen Verdünnen mit Wasser in derselben Form wie a, in glitzernden sechseckigen Blättchen heraus, die unter dem Mikroskop gelb, gelbgrün oder olivgrün erscheinen. In krystallisiertem Zustande ist die Substanz längere Zeit haltbar, aber in alkoholischer Lösung wird sie weit rascher als ihr Ester allomerisiert.

In den Alkoholen, worin das Chlorophyllid b sich recht leicht löst, zeigt es bei dünner Schicht gelbgrüne, bei stärkerer grasgrüne Farbe und bräunlichrote Fluorescenz. In Äther ist es etwas weniger gelbstichig; es ist darin schwer löslich, etwas schwerer als a. In Aceton löst es sich ebenso leicht, in Petroläther ebensowenig wie a.

Die Carbonsäure b ist noch stärker sauer als das Chlorophyllid a. Sie wird aus ihrer ätherischen Lösung (0,02 g in 100 ccm) schon von $n/_{2000}$-KOH fast quantitativ extrahiert. Auch in $n/_{100}$-Na_2CO_3 und in $n/_{100}$-NH_3 geht das Chlorophyllid b vollständig über, sogar noch in $n/_{1000}$-NH_3 reichlich; es verteilt sich ferner zwischen Äther und Natriumbicarbonat. Die alkalischen Lösungen sind grünlichgelb bis gelbgrün, diejenigen von a sind grün.

XII. Die gelben Pigmente der Chloroplasten.

1. Vorkommen der Carotinoide.

Aus herbstlichem Laub hat zuerst Berzelius[1]) durch Extrahieren mit Alkohol einen gelben Farbstoff zu isolieren versucht, den er „Blattgelb" oder „Xanthophyll" nannte. Auch in den grünen Blättern begleiten bekanntlich große Mengen von gelben Pigmenten das Chlorophyll. Ihre schönen Krystalle sind den Botanikern oft unter dem Mikroskop aufgefallen und den Chemikern, die sich mit dem Chlorophyll beschäftigt haben, in den Extrakten begegnet.

Einen krystallisierten gelben Chlorophyllbegleiter hat A. Arnaud[2]) in den Jahren 1885—1887 eingehend untersucht und er hat entdeckt, daß dieser sehr wahrscheinlich identisch ist mit dem Carotin, dem Farbstoff der Möhre (Daucus Carota). Auch A. Hansen hat die Übereinstimmung vermutet und N. A. Monteverde hat sie bestätigt. Aber Analysen des Carotins aus Blättern finden wir nur bei H. Immendorf[3]) mitgeteilt; wären sie richtig, so würde sich daraus ergeben, daß Carotin aus Blättern und aus Carotten verschieden sind.

Das Carotin aus der Mohrrübe hat zuerst Wackenroder[4]) isoliert; Zeise[5]) hat es genauer beschrieben und die Formel C_8H_8 dafür aufgestellt. Später hat A. Husemann[6]) eine ausführliche

[1]) Ann. d. Chem. **21**, 257 [1837].
[2]) Compt. rend. **100**, 751 [1885]; **102**, 1119 und 1319 [1886]; **104**, 1293 [1887]; **109**, 911 [1889]; Bull. soc. chim. **48**, 64 [1887].
[3]) Landwirtschaftl. Jahrbücher **18**, 507 [1889].
[4]) Geigers Magazin f. Pharm. **33**, 144 [1831].
[5]) Ann. d. Chem. **62**, 380 [1847].
[6]) Ann. d. Chem. **117**, 200 [1861]; Archiv d. Pharm., II. Reihe, **129**, 30 [1867].

Arbeit über Carotin veröffentlicht und ihm die Formel $C_{18}H_{26}O$ zugeschrieben. Erst Arnaud hat festgestellt, daß der Farbstoff der gelben Rübe wirklich ein Kohlenwasserstoff ist. Seine Analysen des Carotins und eines Carotinjodides führten zu der Formel $C_{26}H_{38}$, die lange Zeit unbestritten blieb.

Arnaud hat nur das Carotin als Begleiter des Chlorophylls beachtet und ist bei seiner colorimetrischen Bestimmung des Blattgelbs in grünen Pflanzenteilen von der Voraussetzung ausgegangen, daß nur eine einzige gelbe Substanz zu berücksichtigen sei, die von Petroläther extrahiert wird. Mit dem Carotin ist, nach den Andeutungen über Löslichkeit und Aussehen der Krystalle zu urteilen, sehr wahrscheinlich das Erythrophyll von Ch. Bougarel, das Chrysophyll von E. Schunck und wohl auch das Etiolin von N. Pringsheim identisch.

Schon lange Zeit zuvor hatten indessen G. G. Stokes[1]) und H. C. Sorby[2]) erkannt, daß mehrere gelbe Pigmente neben dem Chlorophyll auftreten; Stokes nimmt zwei, Sorby drei Xanthophylle an. Dann hat namentlich J. Borodin[3]) darauf aufmerksam gemacht, daß mehrere krystallisierbare gelbe Stoffe von verschiedener Löslichkeit in den Blättern vorkommen und er hat diese Begleiter des Chlorophylls in 2 Gruppen eingeordnet. Zur einen Gruppe, der des Carotins, gehören Krystalle, welche in Benzin leicht, in Alkohol schwer löslich sind. Die Vertreter der zweiten Gruppe lösen sich sehr wenig in Benzin und leicht in Alkohol. Diese Beobachtungen sind von N. A. Monteverde[4]) und A. Tschirch[5]) und namentlich von M. Tswett[6]) bestätigt und vermehrt und durch die spektralanalytischen Untersuchungen von C. A. Schunck[7]) ergänzt worden.

---

[1]) Proc. Roy. Soc. 13, 144 [1864].

[2]) Quarterly. Journ. of Microscopical Science 11, 215 [1871]; Quarterly. Journ. of Science 8, 64 [1871]; Proc. Roy. Soc. 21, 442 [1873].

[3]) Mélanges biologiques tirés du Bull. de l'Acad. Impér. de St. Petersburg 11, 512 [1883].

[4]) Acta Horti Petropolitani XIII, Nr. 9, 148 [1893].

[5]) Ber. d. d. bot. Ges. 14, 76 [1896]; 22, 414 [1904].

[6]) Ber. d. d. bot. Ges. 24, 316 u. 384 [1906]; Die Chromophylle in der Pflanzen- und Tierwelt, Warschau 1910, Seite 218.

[7]) Proc. Roy. Soc. 63, 389 [1898]; 65, 177 [1899]; 72, 165 [1904].

Tswett[1]) schlägt vor, die verschiedenen gelben Pigmente mit dem Namen Carotinoide zusammenzufassen.

Dennoch ist die Existenz einer Mehrzahl gelber Pigmente in den Blättern auch vielfach bezweifelt worden. Immendorf z. B. spricht den Satz aus: „Das Carotin ist der einzige gelbe Bestandteil des normalen Chlorophyllkerns." H. Molisch[2]) läßt in seiner Abhandlung: „Die Krystallisation und der Nachweis des Xanthophylls (Carotins) im Blatte" die Frage offen und sie wird auch nicht gelöst durch die ausführliche Arbeit von T. Tammes[3]): „Über die Verbreitung des Carotins im Pflanzenreich."

Eine Entscheidung ist durch die Isolierung und Analyse je eines krystallisierten Repräsentanten der beiden Borodinschen Gruppen von Willstätter und Mieg[4]) herbeigeführt worden.

Carotin, aus getrockneten Blättern mit Petroläther isoliert, war wirklich identisch mit dem Pigment der Carotten; die Formel von Arnaud ist auf Grund genauerer Analysen abzuändern. Die neuen Bestimmungen ergeben den Durchschnittswert $CH_{1,406}$, also die empirische Zusammensetzung des Cymols oder noch einfacher $(C_5H_7)_x$. Die Molekulargewichtsbestimmung mit physikalischen Methoden und auf chemischem Wege, nämlich durch Analyse des jodärmsten Jodadditionsproduktes, führt zu der Formel $C_{40}H_{56}$ für den Kohlenwasserstoff.

In alkoholischen Auszügen der Blätter ist ein zweites gelbes Pigment überwiegend, das Willstätter und Mieg in prächtigen Krystallen erhalten und als Xanthophyll bezeichnet haben. Es ist wie Carotin stark ungesättigt und autoxydabel. Seine Analyse ergab mit der Formel $C_{40}H_{56}O_2$, die durch Molekulargewichtsbestimmung und Jodidanalyse Bestätigung fand, eine überraschend einfache Beziehung zum Carotin. Der Sauerstoff befindet sich in der Substanz wahrscheinlich in ätherartiger Bindung.

Xanthophyll und Carotin lassen sich quantitativ trennen durch ihre verschiedene Verteilung zwischen Petroläther und 90prozen-

---

[1]) Ber. d. d. bot. Ges. 29, 630 [1911].
[2]) Ber. d. d. bot. Ges. 14, 18 [1896].
[3]) Flora 87, 205 [1900].
[4]) Abh. IV.

tigem Holzgeist; der Kohlenwasserstoff Carotin ist in den Petroleum-Kohlenwasserstoffen löslich, Xanthophyll, die Sauerstoffverbindung, geht in das sauerstoffhaltige Lösungsmittel über.

Die gelben Farbstoffe sind gegen Säure in so hohem Maße empfindlich, daß sie bei der Gewinnung von Phäophytin nicht unversehrt bleiben und dabei nicht krystallisiert zu erhalten sind. Aber bei der Verseifung des Chlorophylls mit Alkalien bilden die Mutterlaugen ein geeignetes Ausgangsmaterial für ihre Isolierung. Auch bei der Darstellung von Chlorophyll und krystallisierten Chlorophylliden läßt sich der größte Teil der Carotinoide als Nebenprodukt gewinnen, wofür wir im folgenden neue Verfahren mitteilen.

Es fragt sich nun, ob diese beiden genau charakterisierten Verbindungen die einzigen gelben Pigmente der Chloroplasten sind. Die hohen Ausbeuten an den reinen Krystallisationen von Carotin und Xanthophyll machen es jedenfalls unwahrscheinlich, daß außer ihnen noch andere Carotinoide das Chlorophyll in den Landpflanzen begleiten.

Indessen gelangt M. Tswett anscheinend zu einer noch weitergehenden Auflösung des Blattgelbs auf dem Wege der chromatographischen Adsorptionsanalyse (vgl. Kap. VI, Abschn. 1). Beim Filtrieren z. B. einer Schwefelkohlenstofflösung des Blattfarbstoffs durch eine Säule von Calciumcarbonat geht Carotin hindurch, ohne adsorbiert zu werden. Neben den zwei grünen Farbstoffen trennen sich vier Zonen von gelben Pigmenten ab, die Tswett als Xanthophylle α, α', α'', und β unterscheidet. Sie zeigen im Spektrum kleine Differenzen bezüglich der Lage der Absorptionsbänder; leider sind die einzelnen Pigmente nicht in Substanz isoliert und beschrieben worden. Xanthophyll β wandert am schwersten in dem Chromatogramm weiter, die α, α', und α''-Verbindungen werden von Petroläther mit 1% Alkohol herausgelöst, β hingegen erfordert viel größeren Alkoholzusatz.

Tswett[1]) hält das Xanthophyll von Willstätter und Mieg für ein isomorphes Gemisch von zwei oder drei Xanthophyllen,

[1]) Im zitierten Buche Seite 233.

worin α überwiegt. Es ist nicht unmöglich, daß die Annahme des verdienten Botanikers wie so viele seiner Beobachtungen zutrifft. Wenn wir die außerordentliche Ähnlichkeit des Xanthophylls der Blätter mit dem unten erwähnten Xanthophyll aus dem Hühnereidotter — nur der Schmelzpunkt ist unterscheidend — berücksichtigen, so können wir die Möglichkeit nicht ausschließen, daß die Krystalle des Xanthophylls der Chloroplasten aus sehr ähnlichen isomorphen und isomeren Körpern bestehen, für deren Trennung wir keine präparativen Methoden haben. Indessen wäre es auch möglich, daß bei der chromatographischen Analyse Xanthophyll durch Oxydation, der es in adsorbiertem Zustand besonders leicht unterliegt, Veränderung erlitten hat.

Bei der im Kapitel IV behandelten quantitativen Bestimmung der grünen und gelben Blattfarbstoffe bedeuten Carotin und Xantophyll die durch ihre verschiedene Verteilung zwischen Petroläther und Holzgeist getrennten Carotinoide ohne Rücksicht auf die dort wenig wichtige Frage der Einheitlichkeit des Xanthophylls von der Formel $C_{40}H_{56}O_2$.

Wenn wir von den Farbstoffen der Chloroplasten zu den auch in Blüten, Früchten und Wurzeln weit verbreiteten gelben Pigmenten und zu denen tierischer Herkunft übergehen, so treffen wir Carotin und Xanthophyll nicht als die einzigen krystallisierten Carotinoide an. Die Unterscheidung der zwei Gruppen, einer in Benzin leicht, in Alkohol schwer löslicher Farbstoffe und einer anderen von entgegengesetzter Löslichkeit ist ganz allgemein geboten und von Nutzen, auch für die Lipochrome des Tierreichs. Es genügt nicht, die Krystalle auf Grund ihrer Beobachtung unter dem Mikroskop nach ihrer gelben bis roten Farbe und ihrer Blaufärbung mit konzentrierter Schwefelsäure zu beschreiben, sondern ihre Bestimmung hat die Isolierung in größerem Maßstab, die genauere Kennzeichnung und Analyse, zur Voraussetzung.

Das Carotin selbst ist aus einem tierischen Organ, dem Corpus luteum der Kuh, von H. H. Escher[1]) in Willstätters Laboratorium isoliert worden. Einen isomeren Kohlenwasserstoff, Lyco-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 83, 198 [1913].

pin, haben Willstätter und Escher[1]) aus der Beerenfrucht von Lycopersicum esculentum rein dargestellt und untersucht.

Auch ein Isomeres des Xanthophylls ist in reinem Zustand bekannt geworden. Willstätter und Escher[2]) haben aus dem Hühnereidotter das Lutein und damit zum erstenmal ein Carotinoid tierischer Herkunft gewonnen und mit dem Xanthophyll der Blätter verglichen; sie stimmen in fast allen Merkmalen überein, zeigen aber einen bedeutenden Unterschied im Schmelzpunkt.

Zu der physiologischen Bedeutung dieser Farbstoffe gesellt sich ein Interesse in rein chemischer Hinsicht, namentlich bei einem merkwürdigen weiteren Carotinoid, und zwar einem Glied der Xanthophyllgruppe, dem Fucoxanthin, das Willstätter und Page in einer unveröffentlichten Arbeit aus Phäophyceen in reinem Zustand abgeschieden haben. Die schön krystallisierte Verbindung entspricht der Formel $C_{40}H_{54}O_6$; sie zeigt die Gruppenmerkmale der bekannten Carotinoide: in Lösung gelb, ohne Fluorescenz, autoxydierbar, mit konzentrierter Schwefelsäure blaue Färbung gebend. Das Fucoxanthin unterscheidet sich von den anderen namentlich durch die viel stärker basischen Eigenschaften, die sein ätherartig gebundener Sauerstoff besitzt und die durch eine Behandlung mit Alkali noch bedeutend gesteigert werden können.

Hinsichtlich der natürlichen Funktion der Carotinoide ist die Annahme[3]) geäußert worden, daß dieselben bei der Sauerstoffatmung eine Rolle ausüben. Andererseits hat Th. W. Engelmann[4]) in seiner Untersuchung: „Die Farben bunter Laubblätter und ihre Bedeutung für die Zerlegung der Kohlensäure im Lichte" die Annahme gemacht, daß sich das Carotin wie Chlorophyll an der Kohlensäureassimilation beteilige. Es bedarf der Entscheidung auf experimentellem Wege, ob die gelben Pigmente für sich allein an dem Assimilationsprozeß einen Anteil nehmen, der nicht als eine chemische Funktion zu verstehen wäre, oder ob vielmehr die grünen

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 64, 47 [1910].
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 76, 214 [1912].
[3]) Arnaud, Compt. rend. 109, 911 [1889]; Willstätter und Mieg haben sich eine Zeitlang dieser Vorstellung angeschlossen.
[4]) Botan. Ztg. 45, 393 [1887].

und die gelben Pigmente bei der Assimilation zusammenwirken, worauf ihr gemeinsames Vorkommen hinzudeuten scheint.

2. Isolierung von Carotin und Xanthophyll[1]).

Die beiden Carotinoide sind in Lösungen gelb, nicht fluorescierend; sie sind autoxydabel, gegen Alkali beständig, aber in sauren Medien sehr zersetzlich.

Während Willstätter und Mieg Carotin in geringer Ausbeute für sich allein durch Extraktion trockener Blätter isoliert hatten (0,03 g aus 1 kg), gewinnen wir die beiden gelben Pigmente als Nebenprodukte bei der Verarbeitung der Blätter auf Chlorophyll und seine Derivate und zwar gewöhnlich aus 1 kg Blattmehl an reinen Krystallen

0,15—0,2 g Carotin und 0,4—0,7 g Xanthophyll.

Es ist für die Darstellung von reinem Chlorophyll notwendig, aus seiner petrolätherischen Lösung das Xanthophyll mit wasserhaltigem Holzgeist abzutrennen; damit ist aber zugleich die quantitative Trennung des Xanthophylls vom petrolätherlöslichen Carotin gegeben.

Nebenprodukte der Chlorophyllgewinnung. Bei der Isolierung des Chlorophylls (Kap. V, Abschn. 2), wird seine Lösung nach dem Überführen aus Aceton in Petroläther vom Xanthophyll, wovon durch das Wegwaschen des Acetons mit Wasser nur wenig verloren worden, tunlichst befreit durch dreimaliges Waschen mit 80prozentigem Methylalkohol. Diese Auszüge sind intensiv grüngelb. Man extrahiert den Farbstoff aus dem Holzgeist durch Vermischen mit Äther (im ganzen 4—5 l) und Verdünnen mit Wasser. Die Ätherlösung schütteln wir mit 30—50 ccm konzentrierter methylalkoholischer Kalilauge, um etwas mitgegangenes Chlorophyll b zu verseifen. Nach der Wiederkehr der grünen Farbe läßt sich das Chlorophyllin durch mehrmaliges Ausziehen mit Wasser vollständig entfernen. Übrigens kann man auch das Xanthophyll, um bei seiner Isolierung eine chemische Einwirkung zu vermeiden, aus der noch etwas Chlorophyll enthaltenden Lösung krystallisieren

[1]) Unveröffentlicht.

lassen. Der Äther wird mit Natriumsulfat getrocknet, im Wasserbad auf etwa 30 ccm abgedampft und mit 200—300 ccm Methylalkohol vermischt. Wir verjagen nun den Rest des Äthers durch etwas weiteres Einengen und filtrieren die heiße holzgeistige Lösung. Beim Erkalten krystallisiert das Xanthophyll in Täfelchen von ungewöhnlich starkem Oberflächenglanz aus. Setzt man, um die Abscheidung vollständig zu machen, etwas Wasser hinzu, so bildet das Xanthophyll Krystallaggregate, die aus radial angeordneten Bäumchen bestehen. Beim Stehen verwandeln sich die kugeligen Gebilde allmählich in die gewöhnliche Form der Krystallblätter.

Die Ausbeute an Xanthophyll pflegt 0,8 g (oder ein wenig mehr) aus 2 kg Brennesselmehl zu betragen.

In der Petroläthermutterlauge des abgeschiedenen Chlorophylls hinterbleibt am Ende das Carotin. Das Filtrat vom Chlorophyll engt man im Vakuum bei 40° möglichst weit ein und vermischt den öligen Rückstand mit 300 ccm 95prozentigem Alkohol. Das Carotin beginnt sogleich, sich in stahlblau glänzenden Rhomboëdern auszuscheiden und die Krystallisation wird beim Stehen in der Kälte vollständig. Dabei mischt sich den Krystallen ein farbloses Nebenprodukt bei; dieses läßt sich durch Zusatz von 200—300 ccm Petroläther rasch in Lösung bringen. Das Carotin wird sofort filtriert und mit einem Gemisch von 2 Vol. Petroläther und 1 Vol. Alkohol nachgewaschen. Ausbeute 0,25 g.

Übrigens bleibt bei der für die Isolierung des Chlorophylls geeigneten Extraktion des Pflanzenmehles auf der Nutsche mit 80prozentigem Aceton etwas von den gelben Pigmenten, namentlich Carotin, in der Blattsubstanz zurück. Um Carotin vollständig zu extrahieren, muß man etwas mehr vom wasserhaltigen Aceton anwenden als für die Isolierung des Chlorophylls oder man extrahiert das ausgezogene Mehl im Perkolator weiter mit Petroläther. Aus derselben Charge von 2 kg Brennesseln konnten wir so weitere 0,1 g Carotin in reinem Zustand darstellen.

Nebenprodukt des krystallisierten Chlorophylls. Äthyl- oder Methylchlorophyllid aus 2 kg trockenen Heracleumblättern (Kap. IX, Abschn. 1 und 2) wird aus Aceton-Alkohollösung

durch Verdünnen mit Wasser mitsamt den gelben Begleitern auf Talk gefällt, der unter dem Mikroskop neben den grünen die gelben und roten Krystalle aufweist. Beim Auswaschen des Talks auf der Nutsche mit Petroläther und Äther werden die gelben Pigmente vollständig weggelöst. Das Filtrat schütteln wir kräftig durch mit 30 ccm methylalkoholischer Kalilauge und wiederholen diese Behandlung zur Entfernung von grünem Farbstoff, falls es erforderlich ist. Hierauf verdünnt man nach und nach unter Umschütteln im Scheidetrichter mit Wasser, bis die ätherische Schicht sich rein gelb von der grünen Alkalisalzlösung scharf abtrennt. Die letztere wird noch ein zweites Mal ausgeäthert. Nach dem Waschen der gelben Lösung mit Wasser fraktionieren wir sie mit Holzgeist nach dem Vorbild der quantitativen Trennung zur Komponentenbestimmung (Kap. IV, Abschn. 3).

Zu diesem Zweck schütteln wir zweimal mit je 1 l 85prozentigem Methylalkohol, dann viermal mit ebensoviel 90prozentigem durch und führen die Auszüge paarweise in eine Äthermenge über, die am Ende 2,5 l beträgt.

Das Xanthophyll im Äther und Carotin im Petroläther wird mit Wasser gewaschen und anfangs unter gewöhnlichem Druck, am Ende unter vermindertem bei 40° weit eingedampft. Dann fällen wir das Xanthophyll mit 1 l Petroläther aus und filtrieren es nach einigem Stehen im Eisschrank auf der Nutsche durch Talk. Man zieht es daraus mit (etwa 1 l) Äther wieder aus, engt abermals ein und verdünnt mit Methylalkohol, um den letzten Teil des Äthers noch abzudampfen. Damit die Krystallisation einheitlich werde, bringt man den schon ausgefallenen Anteil des Xanthophylls wieder in Lösung, indem man abermals mit kleinen Mengen von Methylalkohol kurze Zeit kocht.

Beim Stehen krystallisiert in einigen Tagen 1 g Xanthophyll aus; die Mutterlauge liefert mit etwas Wasser eine weitere Abscheidung, die nach dem Umkrystallisieren 0,3 g beträgt.

Das Carotin schied sich aus der konzentrierten petrolätherischen Lösung (150 ccm) nach dem Vermischen mit 600 ccm 95prozentigem Alkohol aus (0,3 g) in langgestreckten, spießförmigen Blättern mit dunkelblauem Glanz.

Nebenprodukt von Chlorophyllinkalium. Bei der Verseifung von Rohchlorophyll (aus 5 kg Brennesselblättern) in Äther mit methylalkoholischem Kali (Kap. XVIII) bleibt über dem ausgefällten Chlorophyllinsalz eine ziemlich rein gelbe Lösung, die zunächst nochmals mit konzentrierter alkoholischer Lauge gewaschen und auf 250 ccm eingeengt wird. Dann versetzen wir, ohne auf die beginnende Ausscheidung Rücksicht zu nehmen, zur Trennung der beiden gelben Farbstoffe mit 2 l gewöhnlichem Petroläther und nehmen die entstehende Xanthophyllfällung mit Talk auf. Auf der Nutsche wird mit niedrig siedendem Petroläther nachgewaschen und das Xanthophyll wieder mit 1 l Äther aus dem Talk ausgezogen. Die auf 50 ccm abgedampfte ätherische Lösung versetzt man mit 1 l Methylalkohol und verjagt den Äther vollständig durch weiteres kurzes Einengen. Beim Stehen in der Kälte wird das Xanthophyll schön krystallisiert gewonnen in einer Ausbeute von 2,2 g.

Die petrolätherische Mutterlauge vom Xanthophyll-Talk scheidet beim Stehen in der Kälte langsam noch etwas Xanthophyll ab und wird durch mehrmaliges Waschen mit 90prozentigem Holzgeist gereinigt; sie wird auf einige hundert Kubikzentimeter eingedampft, so daß noch alles Carotin gelöst bleibt, von etwas farblosem Nebenprodukt abfiltriert und mit dem vierfachen Volumen 95prozentigen Alkohols verdünnt. Dann krystallisiert das Carotin in goldglänzenden Blättchen schön aus (0,6 g) und wird durch Waschen mit Petroläther-Alkoholmischung (2 : 1) von etwas Farblosem befreit. Die Mutterlauge ist noch intensiv gefärbt, das Phytol und andere ölige Stoffe halten noch ziemlich viel Carotin gelöst.

Carotin aus Daucus Carota[1]). Für die Gewinnung aus der Carotte ziehen wir das Pulver der bei gelinder Wärme entwässerten Rübe im Perkolator mit Petroläther aus und engen das Perkolat unter vermindertem Druck bei etwa 40° sehr stark ein. Dann kristallisiert das Carotin aus, noch mit großen Mengen farbloser Nebenprodukte vermischt. Es läßt sich dadurch reinigen,

[1]) Aus der Promotionsarbeit von H. H. Escher, Zur Kenntnis des Carotins und des Lycopins, Zürich 1909.

daß man es eine Reihe von Malen aus Schwefelkohlenstofflösung mit absolutem Alkohol in Fraktionen fällt. Zuerst scheiden sich farblose Stoffe aus, dann reines Carotin.

Die Ausbeute aus 5000 kg frischen, d. i. 472 kg trockenen Möhren betrug 125 g Carotin in reinem Zustand.

Das nämliche Carotin hat aus einem tierischen Organ, dem Corpus luteum der Kuh, Escher isoliert und aus 10000 Ovarien 0,45 g reinen Kohlenwasserstoff gewonnen.

Das mit dem Carotin isomere Pigment der Tomate, Lycopin, haben Willstätter und Escher nach folgendem Verfahren isoliert:

Reine Tomatenkonserven des Handels wurden in Mengen von etwa 8 kg zur Entwässerung in Pulverflaschen mit 4 l 96prozentigem Alkohol angeschüttelt, die koagulierte Masse koliert und mit gelindem Druck abgepreßt. Das Umschütteln mit 2—3 l Alkohol und Abpressen wiederholten wir und preßten dann mit stärkerem Druck den Brei zu einer krümmeligen Masse aus, um diese schließlich auf dem Dampfkessel vollständig zu trocknen und in der Pulvermühle zu mahlen. Das Tomatenmehl wurde in Perkolatoren mit Schwefelkohlenstoff erschöpfend extrahiert und der Auszug soweit als möglich unter vermindertem Druck eingedampft, gegen Ende in einem Bad von 40°. Dabei schieden sich feine Nädelchen von Lycopin aus. Der tief rotbraune Brei wurde mit dem dreifachen Volumen absoluten Alkohols verdünnt und nach dem Absaugen auf der Nutsche mit Petroläther gewaschen.

Das Rohprodukt von Lycopin haben wir durch Fällen mit absolutem Alkohol aus Schwefelkohlenstofflösung oder besser durch Umkrystallisieren aus Gasolin (Siedepunkt 50—80°) gereinigt, wovon beim Kochen 4—5 l für 1 g Lycopin erforderlich waren. Die filtrierte Gasolinlösung schied beim Abkühlen in der Kältemischung ein lockeres braunes Pulver von prismatischen Krystallen ab.

Aus alkoholischen Mutterlaugen des Tomatenfarbstoffs krystallisierten bei langem Stehen kleine Mengen von Carotin.

74 kg des „Purée di Pomodoro Concentrata" ergaben 5,6 kg trockenes Pulver und weiterhin 11 g umkrystallisierten Farbstoff, d. i. 0,2% der Trockensubstanz.

Das mit dem Xanthophyll isomere und ihm sehr ähnliche Pigment der Hühnereier, Lutein, ist von Willstätter und Escher aus 6000 Dottern dargestellt worden in einer Ausbeute von 4 g in rohem, etwa 2,6 g in reinem Zustand.

3. Beschreibung[1]).

Carotin. Die Zusammensetzung und Molekulargröße entspricht der Formel $C_{40}H_{56}$; es vermag Krystallalkohol aufzunehmen.

Carotin krystallisiert in Rhomboedern (Tafel III, Fig. 1) und in rhombenförmigen, fast quadratischen, häufig eingekerbten Täfelchen (Tafel III, Fig. 2) von lebhaftem, bald kupfrigem, bald blauem Oberflächenglanz. In der Durchsicht sind dieselben und zwar selbst dünne mikroskopische Blättchen rot.

Der Schmelzpunkt, etwas abhängig von der Art des Erhitzens, ist ca. 174° (korr.), ein wenig zuvor sinternd.

Der Kohlenwasserstoff ist in siedendem Alkohol und Holzgeist sehr schwer löslich, in kaltem beinahe unlöslich. Von siedendem Äther sind ca. 900 ccm für 1 g erforderlich. In niedrig siedendem Petroläther löst sich Carotin ziemlich schwer, 1 g am Rückflußkühler in 1,5 l. In Aceton ist es schwer, in Benzol recht leicht, sehr leicht in Chloroform, spielend in Schwefelkohlenstoff löslich.

Charakteristisch ist die Verteilung zwischen Petroläther und Alkohol. Wird die Lösung in Petroläther mit Holzgeist versetzt, der ganz wenig Wasser enthält, so bleibt die methylalkoholische Schicht farblos.

Die Lösungen sind intensiv gelb, konzentrierte tief orangefarbig, in Schwefelkohlenstoff aber rot.

In konzentrierter Schwefelsäure löst sich Carotin mit indigoblauer Farbe.

Carotin ist ungesättigt und autoxydierbar; beim Stehen an der Luft wird es gebleicht und vermehrt dabei sein Gewicht um 35%, in feuchtem Raum um 41%. Die Krystalle behalten beim Ausbleichen ihre scharf begrenzte Form bei.

---

[1]) Abh. IV und Zeitschr. f. physiolog. Chem. 64, 47 [1910] und 76, 214 [1912] und 83, 198 [1913]; eine farbige Wiedergabe unserer Krystallisationen der Carotinoïde enthält die Abhandlung im 64. Band der Zeitschr. f. physiolog. Chemie.

Mit Jod verbindet sich Carotin zu einem in dunkelvioletten, kupfrig glänzenden Prismen krystallisierenden Jodid von der Zusammensetzung $C_{40}H_{56}J_2$.

Beziehungen des Carotins zum Cholesterin, die sich in der Literatur oft erwähnt finden, existieren in Wirklichkeit nicht.

Xanthophyll. Es neigt zur Krystallisation mit Äthyl- und Methylalkohol; frei von Lösungsmitteln wird es bei der Abscheidung mit Petroläther aus Chloroform. Seine Formel ist $C_{40}H_{56}O_2$.

Die typischen Krystallformen sind längliche Täfelchen (Tafel III, Fig. 3), und Prismen mit schwalbenschwanzförmigen Einkerbungen (Tafel III, Fig. 4). Die Krystalle sind pleochromatisch und zeigen starken, oft stahlblauen Glanz. In der Durchsicht sind sie gelb und nur da rot, wo mehrere Krystalle sich kreuzen. Man unterscheidet sie daher leicht von Carotin, während die Farbe in Lösungen sehr ähnlich ist. Auch das Verhalten gegen konzentrierte Schwefelsäure, gegen Halogen und gegen Luftsauerstoff ist das nämliche. Eine ätherische Lösung des Xanthophylls bleicht bei Zutritt von Luft auch im Dunkeln sehr rasch aus, viel rascher als Carotin.

Xanthophyll gibt, in alkoholischer Lösung mit etwas konzentrierter Salzsäure versetzt, keinen Farbumschlag, während Tswett anführt, daß seine Xanthophylle, besonders β, beim Versetzen der Alkohollösung mit Salzsäure eine grüne, dann blaue Färbung zeigen. Aber schon bei der Einwirkung schwächerer Säuren wird Xanthophyll sehr leicht, noch eher als Carotin, verdorben.

Die Löslichkeit des Xanthophylls ist wesentlich verschieden von der des Carotins. Vermischt man nämlich die alkoholische Xanthophyllösung mit Petroläther und entmischt man sie mit wenig Wasser, so befindet sich der weitaus größte Teil des Pigmentes in der weingeistigen Schicht.

In Petroläther ist Xanthophyll unlöslich, so daß er sich nicht einmal anfärbt. In Holzgeist löst es sich zwar schwer (1 g in 700 ccm siedendem, in 5 l kaltem Methylalkohol), aber doch weit leichter als Carotin. In Äthylalkohol ist es noch beträchtlich leichter, in Äther ziemlich leicht (1 g in 300 ccm beim Kochen), in Chloroform sehr leicht, in Schwefelkohlenstoff ziemlich schwer löslich.

Schmelzpunkt 173—174° (korr.).

Xanthophyll dürfte den Sauerstoff in ätherartiger Bindung enthalten, denn es gibt weder Carbonyl-, Alkohol-, noch Säurereaktionen. Es scheint aber ein sehr leicht dissoziierendes Additionsprodukt zu bilden, wenn man seine ätherische Lösung mit konzentrierter methylalkoholischer Kalilauge versetzt. Viel vom Xanthophyll geht in das Alkali und wird beim Ausäthern nur träge abgegeben, aber sofort bei Zusatz von Wasser. Eine Veränderung des Xanthophylls erfolgt dabei nicht.

Vergleich der Farbintensitäten[1]). Carotin und Xanthophyll sind darin sehr verschieden, aber es gibt kein einfaches Verhältnis der Farbstärken, sondern es ist mit dem Lösungsmittel und mit der Konzentration wechselnd. Stets ist Carotin farbstärker. Die verdünnten Lösungen beider sind nicht vergleichbar, weil sie (in Schwefelkohlenstoff wie in Äther) in der Nuance verschieden sind: Carotin mehr rot, Xanthophyll eher grünstichig.

Die Reinheit der für den Vergleich angewandten Präparate hat die Elementaranalyse bestätigt (Carotin gef. nach Pregl C 89,4, H 10,6; Xanthophyll gef. C 84,2, H 10,1).

10^{-6} Mol in 200 ccm Schwefelkohlenstoff.

Schicht von Carotin in mm	Schicht von Xanthophyll	Intensitätsverhältnis
12	50	4,1
25,5	87	3,4
38,5	120	3,1
85	180	2,1

10^{-6} Mol Carotin in 200 ccm Petroläther-Äther, Xanthophyll in Äther.

Schicht von Carotin in mm	Schicht von Xanthophyll	Intensitätsverhältnis
10	20	2,0
40	60	1,5
91	120	1,3

Die Farbe der gelben Pigmente erscheint in Schwefelkohlenstoff intensiver als in den anderen Lösungsmitteln; beim Carotin läßt

[1]) Unveröffentlicht.

sich das Verhältnis schwer bestimmen, weil auch eine dünne Schicht der Schwefelkohlenstofflösung rot ist, beim Xanthophyll finden wir die Schwefelkohlenstofflösung fünfmal intensiver als die ätherische.

Tabelle für den Vergleich von Carotin und Xanthophyll.

	$C_{40}H_{56}$	$C_{40}H_{56}O_2$
Typische Krystallform	Rhombische Täfelchen	Schwalbenschwanzförmige Prismen
Farbe in der Durchsicht	rot	gelb
Geht beim Entmischen von Petroläther-Holzgeist	in die obere Schicht	in die untere Schicht
In Petroläther	beträchtlich löslich	unlöslich
In Alkohol	sehr schwer löslich	beträchtlich löslich
In Schwefelkohlenstoff	spielend löslich	ziemlich schwer löslich

Absorptionsspektra. Die alkoholische Lösung von Carotin und Xanthophyll zeigt im Spektroskop ein aus zwei Bändern im Blau und Indigblau bestehendes Spektrum außer der fast bei Beginn von Violett einsetzenden Endabsorption.

Die spektrographische Aufnahme (Kap. XXV, Tafel XI) hebt aus dieser Endabsorption in der bei der Beobachtung mit dem Auge bereits dunkel erscheinenden Region des äußern Violett ein deutlich begrenztes drittes Band heraus (für Carotin bei $\lambda = 425\ \mu\mu$, für Xanthophyll bei $\lambda = 420\ \mu\mu$).

Die Streifen sind bei Xanthophyll gegenüber Carotin etwas gegen Violett hin verschoben.

Im Blätterextrakt werden das 2. und das 3. Band der Carotinoide zugedeckt durch die sehr intensive Absorption der Chlorophyllkomponenten im Violett. Das erste Absorptionsband der gelben Blattfarbstoffe fällt in die Lücke zwischen den Bändern V und VI des Chlorophylls a, ist aber nahezu kongruent mit dem Band VIII einer nicht zu geringen Schicht von Chlorophyll b.

Die Lichtabsorption der Carotinoide ergänzt also nicht diejenige der Chlorophyllkomponenten.

In Schwefelkohlenstoff wird der Unterschied zwischen Carotin und Xanthophyll größer. Die Absorptionsstreifen sind hier stark gegen das rote Ende des Spektrums gewandert. Während Carotin

in der sichtbaren Region nur ein Band im Grün und eines im Blau aufweist, kommt bei Xanthophyll noch ein deutliches drittes Band im Indigblau hinzu.

Messungen mit dem Gitterspektroskop:

0,005 g in 1 l Alkohol (Tafel XI).

Schichtdicke in mm	Carotin		Xanthophyll	
	5	10	5	10
Band I	492— —478	492—476	484— —472	488—471
„ II	459— —446	459—445	454— —441	454—440
Endabsorption[1])	415—	419—	419—	420—

0,005 g in 1 l Schwefelkohlenstoff (Tafel XI).

Schichtdicke in mm	Carotin		Xanthophyll	
	10	20	10	20
Band I	524...510	525— —508	515...501	516— —501
„ II	489—475	490—474	482—469	483—467
„ III	—	—	—	447·441

Lycopin. Das Isomere des Carotins bildet ein carminrotes, samtglänzendes Aggregat von langgestreckten, am Ende zerklüfteten Prismen oder von Nadeln; unter dem Mikroskop sind die Krystalle bräunlichrot bis carminrot; Schmelzpunkt 168 bis 169° (korr.).

Die Lösung in Äther tingiert die Glaswand viel weniger als die Carotinlösung. Die heiß gesättigte alkoholische Lösung ist dunkelgelb, die Lösung in Schwefelkohlenstoff schön blaustichig rot.

Lycopin ist in Alkohol und anderen Solvenzien schwerer löslich als Carotin; 1 g erfordert 3 l siedenden Äther, 10—12 l siedenden Petroläther, 50 ccm Schwefelkohlenstoff bei gewöhnlicher Temperatur. Bei der Verteilung zwischen Alkohol und Petroläther verhält sich Lycopin wie Carotin.

In den Reaktionen ist Lycopin dem Carotin ähnlich, es addiert noch begieriger Sauerstoff.

[1]) Den eigentlichen Beginn der Endabsorption, d. i. die vom Violett abgewendete Begrenzung des dritten Bandes, bestimmten wir durch die spektrographische Aufnahme bei einer Schichtdicke von 10 mm für Carotin bei $\lambda = 430\ \mu\mu$, für Xantophyll bei $\lambda = 425\ \mu\mu$.

Das Absorptionsspektrum in Schwefelkohlenstoff weist zwei Bänder im Grün und eines im Blau auf.

Lutein. Gegenüber dem Xanthophyll ist nur ein deutlicher Unterschied bei dem Isomeren beobachtet worden; es schmilzt erst bei 195—196° (korr.).

4. Gewinnung und Beschreibung des Fucoxanthins[1]).

Im V. Kapitel (Abschn. 4) ist die Extraktion von Phäophyceen in größerem Maßstab und die Verarbeitung auf Chlorophyll beschrieben worden. Das Filtrat vom Rohchlorophylltalk enthält das gesamte Fucoxanthin mit einem großen Teile des Xanthophylls und mit Spuren von Chlorophyll. Die Isolierung des Fucoxanthins[2]) gelingt nach dem Verfahren, das zur quantitativen Bestimmung der Phäophyceenfarbstoffe gedient hat. Auf Grund ihrer etwas verschiedenen Verteilung zwischen wasserhaltigem Methylalkohol und Äther-Petroläther wird das Fucoxanthin vom Xanthophyll getrennt und zu gleicher Zeit auch von der Hauptmenge farbloser Begleiter, die seine Ausfällung erschweren. Sie bleiben zum großen Teil in der ätherischen Schicht.

Die Braunalgen sind gewöhnlich in Mengen von 15—20 kg verarbeitet worden. Die vereinigten fucoxanthinhaltigen Filtrate vom Rohchlorophyll (40 l aus 20 kg) werden in Portionen von je 4 l in 1 l eines Gemisches von Petroläther (3 Vol.) und Äther (1 Vol.) eingetragen und mit 1,5 l Wasser versetzt. Nach dem Durchschütteln ist die wässerig-acetonige Schicht nur schwach gelblichgrün. Die erhaltenen tieforangegelben Farbstofflösungen werden durch sehr vorsichtiges Waschen, wobei allzu leicht lästige Emulsionen vorkommen, vom Aceton befreit und im Vakuum bei gewöhnlicher Temperatur bis auf 500 ccm Gesamtvolumen eingedampft. Dabei können schon Flocken von Fucoxanthin ausfallen, man verdünnt wieder mit $^1/_2$ l Äther. Nun wird die Trennung der beiden gelben Pigmente vorgenommen durch etwa vier-

[1]) Aus einer unveröffentlichten Untersuchung von R. Willstätter und H. J. Page.

[2]) Zur Geschichte des Fucoxanthins, dessen Lösungen schon M. Tswett sowie H. Kylin beschrieben haben, siehe das IV. Kap., Abschn. 5.

maliges vorsichtiges Ausschütteln mit je 1 l 70prozentigem Holzgeist, der mit Petroläther gesättigt worden, und noch zweimaliges Ausziehen mit der halben Menge. Aus der dunkelbraunen, orangefarbig tingierenden methylalkoholischen Lösung entfernt man mitgeführtes Xanthophyll durch einmaliges Ausschütteln mit der gleichen Menge einer Mischung aus 5 Vol. Petroläther und 1 Vol. Äther. Da diese Waschflüssigkeit einen nicht unerheblichen Teil des Fucoxanthins mitnimmt, so dampft man sie im Vakuum zu einigen Hundert Kubikzentimeter ein, verdünnt mit derselben Menge Äther und zieht aufs neue zweimal mit 70prozentigem Holzgeist aus. Diese letzten Auszüge werden natürlich auch mit Äther-Petroläther gewaschen. Aus allen holzgeistigen Lösungen führen wir nun portionenweise durch vorsichtiges Entmischen das Fucoxanthin in viel Äther über und engen die filtrierte Lösung bei niedriger Temperatur auf gegen 200 ccm ein, d. i. bis fast zur Sirupdicke. Auf Zusatz von niedrig siedendem Petroläther (höchstens 1 l) fällt das Fucoxanthin schon in ziemlich reinen, ziegelroten Flocken aus. Die Ausbeute an solchem Rohprodukt betrug 2 g.

In diesem Gang der Isolierung sind Reagenzien, welche Mineralbestandteile enthalten (z. B. Brunnenwasser), vermieden, auch keine Trocknung mit Calciumchlorid vorgenommen worden. Bei einigen ersten Versuchen zur Gewinnung von Fucoxanthin haben Willstätter und Forsén diese Vorsicht nicht geübt nnd sind zu sonderbaren Beobachtungen gekommen, zu Fucoxanthinpräparaten, welche nach einmaligem und nach wiederholtem Umkrystallisieren aus Methylalkohol einheitliche, schöne Prismen vom Schmelzpunkt 145—150° bildeten und beim Veraschen 3—4% reines CaO hinterließen.

Reines Fucoxanthin ist hingegen aschefrei. Seine Zusammensetzung wird durch die Formel $C_{40}H_{54}O_6$ ausgedrückt.

Das Rohprodukt ist in allen organischen Lösungsmitteln, außer Methylalkohol und Petroläther, sehr leicht löslich. Aus wenig Methylalkohol läßt es sich sehr gut umkrystallisieren und in bläulich glänzenden, braunroten, langen Prismen von monoklinem Habitus erhalten (Tafel III, Fig. 5). Unter dem Mikroskop sind die

Krystalle bernsteingelb und braun, wo mehrere Prismen sich kreuzen; das Pulver ist ziegelrot.

Von umkrystallisierter Substanz sind in 100 g Methylalkohol beim Kochen 1,66, bei 0° 0,41 g löslich, viel mehr vom Rohprodukt. Die Krystalle lösen sich ziemlich schwer in Äther, ziemlich leicht in Schwefelkohlenstoff, leicht in Äthylalkohol.

In einer sehr charakteristischen zweiten Krystallform tritt Fucoxanthin auf, wenn man seine weingeistige Lösung unter Ausschluß von Luft über Wasser aufstellt, nämlich in großen, regelmäßigen sechsseitigen Tafeln (Tafel III, Fig. 6). Sie sind rot, in der Durchsicht unter dem Mikroskop rein gelb bis rot je nach der Dicke.

Der Schmelzpunkt des Fucoxanthins liegt bei 159,5 bis 160,5° (korr.).

Die ätherische Lösung ist orangegelb, rein gelb tingierend, die alkoholische Lösung ist etwas roststichiger und tingiert bräunlich gelb, viel mehr rot ist Fucoxanthin in Schwefelkohlenstoff.

Fluorescenz zeigt das Pigment nicht.

Die feste Substanz absorbiert keinen Sauerstoff; nach dem Trocknen erfährt sie an der Luft eine Gewichtszunahme von etwa 7% und zeigt dann sehr große Gewichtsschwankungen je nach der Feuchtigkeit der Luft. Im Exsiccator geht das Präparat nachher zum ursprünglichen Gewicht zurück. Die Lösungen des Fucoxanthins hingegen verderben leicht, sie scheinen namentlich im Licht gegen Sauerstoff empfindlich zu sein.

Jod wird von Fucoxanthin momentan addiert und man kann aus ätherischer Lösung ein krystallisiertes Jodid erhalten.

Charakteristisch für das Pigment sind seine basischen Eigenschaften. Während Carotin und Xanthophyll nur mit konzentrierter Schwefelsäure die bekannte blaue Farberscheinung geben, reagiert die ätherische Lösung des Fucoxanthins mit Salzsäure genau wie eine schwache Stickstoffbase. Von 30prozentiger Salzsäure wird die ätherische Lösung sofort ganz entfärbt und die saure Schicht zeigt die prachtvoll blauviolette, in großer Verdünnung himmelblaue Farbe eines Farbsalzes, wahrscheinlich eines Oxoniumsalzes. Noch 25prozentige Salzsäure färbt sich an, allerdings schwach. Das Farbsalz wird von der wässerigen Salzsäure

nur infolge ihres Äthergehaltes gelöst. Isoliert man die Substanz aus der Säure, so ist sie verändert und reagiert teilweise schon mit verdünnter Säure.

In wasserfreiem Äther gibt Fucoxanthin mit Chlorwasserstoff einen flockigen Niederschlag seines Chlorhydrates.

Auch das Verhalten gegen Alkalien ist sehr merkwürdig. Fucoxanthin zeigt keine sauren Eigenschaften, es geht aus Äther gar nicht in wässerige Lauge über. Hingegen reagiert es mit konzentrierten alkoholischen Alkalien unter Bildung eines leicht dissoziierenden Additionsproduktes, wobei zugleich eine Veränderung des Fucoxanthins stattfindet. In diesem Verhalten erinnert es an Pyron, das nach R. Willstätter und R. Pummerer[1]) durch Alkalien sowie Alkoholate schon in der Kälte aufgespalten wird.

Die feste Substanz löst sich viel leichter in methylalkoholischer Kalilauge als in Methylalkohol. Aus Äther geht ein großer Teil des Fucoxanthins in konzentrierte methylalkoholische Kalilauge über und wird hieraus nur ganz träge an Äther abgegeben, indessen sofort und vollständig auf Zusatz von Wasser. Der Farbstoff in der so erhaltenen wiederum gelben, ätherischen Lösung besitzt auffallend stark basische Eigenschaften, viel stärkere wie unversehrtes Fucoxanthin. Die Lösung reagiert nämlich schon mit 0,001 prozentiger Salzsäure, einen großen Teil des Farbstoffs gibt sie an 1 prozentige, fast alles, indessen unter Abscheidung von Flocken, an 3 prozentige Salzsäure ab.

Absorptionsspektrum. 0,005 g Fucoxanthin in 1 l Alkohol.

Schichtdicke in mm	5	10
Band I	486—469	493—469— —
„ II	455—440	454—
Endabsorption	440—	

[1]) Ber. d. d. chem. Ges. 37, 3740 [1904] und 38, 1461 [1905].

XIII. Phäophytin[1]).

1. Definition.

Nach Willstätter und Hocheder (1907) entsteht aus dem Chlorophyll bei vorsichtiger Behandlung mit Oxalsäure das Phäophytin. Es ist das Gemisch der beiden Phytylphäophorbide a und b.

Die Einwirkung von Säuren auf Chlorophyll und auf die Phylline besteht darin, daß das komplex gebundene Magnesium quantitativ abgespalten wird; es wird dabei einfach durch Wasserstoff ersetzt. Die entstehenden Produkte sind frei von Mineralbestandteilen. Die beiden Estergruppen im Chlorophyll bleiben intakt.

Die Farbe schlägt von Grün in Braun um; die Löslichkeit wird stark vermindert, so daß es gelingt, in der Form des magnesiumfreien Derivates beinahe den ganzen Chlorophyllgehalt der Extrakte abzuscheiden; die Zersetzlichkeit wird viel geringer, namentlich ist die Empfindlichkeit in alkoholischer Lösung (Allomerisation) beseitigt.

Die Möglichkeit, mittels starker Säuren das Chlorophyll zu verändern, war seit Jahrzehnten bekannt. Es war aber nicht gelungen, ein reines Produkt der Säurespaltung zu isolieren und dadurch zum Phytol zu gelangen, das ein Drittel des Chlorophyllmoleküls ausmacht. Die Einwirkung von Säure auf die Blätterextrakte ist zumeist so gehandhabt worden, daß die Chlorophyllsubstanz dabei verdorben wurde.

Die Bildung des Phäophytins war aber nicht allein durch die gelinde Ausführung der Säurespaltung bedingt, sondern namentlich durch die Anwendung guter Rohchlorophyllösungen. Jeder

[1]) Abh. III und VII.

Fortschritt in der Bereitung der Blätterextrakte bedeutete zugleich eine Verbesserung der Phäophytingewinnung.

Das beim Behandeln des Rohchlorophylls mit Säure entstehende Phäophytin eignet sich für den weiteren Abbau des Chlorophylls und ist das beste Ausgangsmaterial zur Gewinnung von Phytol.

2. Die älteren Methoden der Säurespaltung des Chlorophylls[1]).

Die Einwirkung von Säure auf Chlorophyll hat E. Frémy zu untersuchen begonnen und er hat die Namen Phylloxanthin und Phyllocyanin eingeführt, die in der Folge ihre Bedeutung sehr gewechselt haben.

Frémy[2]) ließ auf die aus alkoholischem Extrakte mit Aluminiumhydroxyd und Alkalilauge gebildete gelbe Fällung oder direkt auf den Abdampfrückstand des Extraktes starke Salzsäure und Äther einwirken. Nach der Scheidung war der Äther rein gelb, die Säure blau; Frémy nahm in diesen Schichten zwei Komponenten des Chlorophylls an, von denen er die gelbe Phylloxanthin, die blaue Phyllocyanin nannte. Darauf erhitzte Frémy alkoholische Extrakte mit Bariumhydroxyd und setzte aus dem Bariumsalz mit Schwefelsäure die sogenannte Phyllocyaninsäure in Freiheit. Er vermutete im Chlorophyll ein farbiges Fett, in welchem dem indifferenten Phylloxanthin die Rolle des Glycerins, dem Phyllocyanin diejenige der Fettsäure zukam. Später gab Frémy der Hypothese den Vorzug, Chlorophyll sei ein Gemisch von Phylloxanthin und dem Kaliumsalz der Phyllocyaninsäure.

Ursprünglich lag also im Phylloxanthin das natürlich ganz unreine und durch Säure veränderte Gemisch gelber Begleiter vor und im Phyllocyanin ein Gemisch von je nach der Darstellung verschiedenen Spaltungsprodukten der beiden Chlorophyllkomponenten durch Säure.

Mit denselben Namen hat E. Schunck[3]) zwei Produkte bezeichnet, die er in seinen Untersuchungen während der Jahre 1885

[1]) Abh. XX.

[2]) Compt. rend. 50, 405 [1860]; 61, 188 [1865]; 84, 983 [1877].

[3]) Proc. Roy. Soc. 38, 336 [1885]; 39, 348 [1885]; 42, 184 [1886]; 44, 48 [1888]; 50, 302 [1891]; 55, 351 [1894].

bis 1896 durch energische Einwirkung von Salzsäure auf Chlorophyll dargestellt hat, ohne übrigens ihre Analyse zu veröffentlichen.

Frisches Gras wurde mit siedendem starkem Alkohol extrahiert und die filtrierte Lösung mit einem Strom von Chlorwasserstoffgas behandelt. Dabei schied sich eine dunkle Masse aus, welche beim Behandeln mit Äther und konzentrierter Salzsäure zwei Anteile lieferte: der nicht in starke Salzsäure gehende, in viel größerer Ausbeute entstehende Anteil ist Phylloxanthin, der von der Säure aufgenommene, aus Eisessig wiederholt umkrystallisierte, Phyllocyanin.

Phyllocyanin: krystallinisch, in Äther dunkelgrün oder olivgrün.

Phylloxanthin: äußerst ähnlich dem Phyllocyanin, aber Fett enthaltend; gibt Asche, die stets einen integrierenden Gehalt an Eisen aufweist. In Lösung gelbbraun. Wird die ätherische Lösung mit konzentrierter Salzsäure geschüttelt, so bleibt diese farblos.

Hinsichtlich der Beziehung zwischen beiden kamen E. Schunck und L. Marchlewski[1]) zu dem Ergebnis, daß das Phylloxanthin Zwischenprodukt der Bildung von Phyllocyanin sei.

M. Tswett[2]) hat die Bildung von Phylloxanthin und Phyllocyanin unter den Versuchsbedingungen von E. Schunck nachgeprüft und die beiden Spaltungsprodukte in Übereinstimmung mit einer alten Vermutung von G. G. Stokes[3]) auf die zwei Komponenten des Chlorophylls zurückgeführt. Mit Hilfe seiner chromatographischen Methode zeigte er, daß Phylloxanthin im wesentlichen das erste Spaltungsprodukt des Chlorophylls b, Phyllocyanin ein sekundäres Spaltungsprodukt der Chlorophyllkomponente a ist. Für die Erklärung der Beobachtungen fehlt nur die Kenntnis der verseifbaren Gruppen im Chlorophyll und die Berücksichtigung der Allomerisation, durch welche alle die Chlorophyllderivate der älteren Literatur verdorben waren.

---

[1]) Ann. d. Chem. 278, 329 [1894]; 284, 81 [1894]; Proc. Roy. Soc. 57, 314 [1895]; L. Marchlewski, Die Chemie des Chlorophylls [1895], Seite 63; Roscoe-Schorlemmer VIII, 889; Bioch. Zeitschr. 3, 303 [1907].

[2]) Bioch. Zeitschr. 5, 6 [1907]; 6, 373 [1907]; 10, 404 [1908].

[3]) Proc. Roy. Soc. 13, 145 [1864]; siehe dazu Proc. Roy. Soc. 50, 311 [1891].

Dem Chlorophyll viel näher stehend ist ein Produkt, das F. Hoppe-Seyler [1]) im Jahre 1879 durch Extraktion von Gras mit siedendem Alkohol gewonnen und aus den eingedunsteten Extrakten durch eine Folge von Trennungs- und Reinigungsoperationen isoliert hat, das Chlorophyllan. Obwohl krystallisierend, war es keine reine Verbindung. Es lieferte viel Asche, die 1,38% Phosphor und 0,34% Magnesium enthielt, auch wies es einen Gehalt an Glycerin und Cholin auf. Seine Zusammensetzung hat daher Hoppe-Seyler zu der Vermutung geführt, Chlorophyll zähle zu den Lecithinen.

Ein ähnliches Präparat hat um die gleiche Zeit A. Gautier [2]) erhalten und als krystallisiertes Chlorophyll beschrieben.

Die Bildung des Chlorophyllans, dessen Farbe in Lösungen olivgrün ist, beruht nach Willstätter und Hug auf der nicht beabsichtigten Zersetzung des bei der Behandlung mit Lösungsmitteln schon teilweise allomerisierten Chlorophylls durch Pflanzensäuren. Das Chlorophyllan läßt sich nach der Methode von Hoppe-Seyler nur aschehaltig und nur als Gemisch mit farblosen Stoffen (Fett, Lecithin u. a.) erhalten.

3. Gewinnung des Phäophytins.

Nach Willstätter und Hocheder [3]). Das Mehl von getrockneten Brennesseln oder Gras wurde in Flaschen mit 96prozentigem Alkohol (1½—2 l für 1 kg) in der Kälte extrahiert; nach dem Absaugen und Nachwaschen diente der Extrakt zum Ausziehen einer gleichen weiteren Charge.

Der erhaltene Doppelextrakt (Kap. III, Abschn. 2a) zeigt bei der Einwirkung von Säure einen schnellen Farbumschlag in Dunkelbraun und zugleich Verschwinden der starken Fluorescenz.

Die Reaktion wurde durch Zufügen einer in der Kälte frisch bereiteten konzentrierten Lösung krystallwasserhaltiger Oxalsäure in 96prozentigem Alkohol bewirkt. In der Regel waren 2,5—5 g Oxalsäure für den Liter Doppelextrakt erforderlich. Zunächst

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 3, 339 [1879]; 4, 193 [1880]; 5, 75 [1881].
[2]) Compt. rend 89, 861 [1879].
[3]) Ann. d. Chem. 354, 218 [1907].

versetzte man die Chlorophyllösung auf einmal mit 2,5 g Oxalsäure pro Kilogramm Pflanzenmaterial und fügte, wenn daraufhin in $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde kein gänzlicher Wechsel der Farbe eingetreten ist, weiter in kleinen Portionen mit Pausen die noch zur Vervollständigung des Farbenumschlags erforderliche Säuremenge hinzu.

Schon während des Zufügens der Oxalsäure beginnt das Ausfallen eines flockigen Niederschlages, der hauptsächlich aus Phäophytin und oxalsauren Salzen, namentlich von Magnesium und Calcium, ferner von Kalium und Aluminium besteht. Bei eintägigem Stehen wurde die Abscheidung vollständig und der Niederschlag setzte sich so dicht zu Boden, daß sich die Hauptmenge der Flüssigkeit dekantieren ließ. Die Mutterlauge enthält noch etwas Phäophytin und sehr viel von den gelben Begleitern des Chlorophylls, aber man bekommt sie daraus nicht in krystallisiertem Zustand.

Das ausgeschiedene Gemisch von Phäophytin und Oxalaten wurde auf der Nutsche abgesaugt, mit Alkohol mehrmals nachgewaschen und im Vakuumexsiccator getrocknet. Zur Beseitigung der Salze und ersten Reinigung diente immer eine Umfällung aus Chloroformlösung durch Alkohol; die Metallverbindungen hinterblieben beim Auflösen und die Mutterlauge hielt organische Verunreinigungen zurück. Nur bei Gewinnung von Phäophytin in sehr großem Maßstab war es lohnend, noch eine Laugenportion aus der Chloroform-Alkoholmischung zu isolieren.

Die Filtration der Chloroformlösung ist schwierig und erfordert ziemlich große Verdünnung. Zunächst wurde mit großen Nutschen an der Pumpe gearbeitet, danach war, da etwas von dem feinen Niederschlag mitgerissen worden, noch drei- bis viermaliges Filtrieren durch glatte Filter notwendig, um das Phäophytin aschefrei zu erhalten. Das Filtrat wird unter vermindertem Druck bei gewöhnlicher Temperatur stark eingeengt und die dicke fast schwarze Lösung mit dem fünf- bis zehnfachen Volumen Alkohol (von 96%) gefällt.

Die Ausbeute an Phäophytin betrug bei Verarbeitung vieler Pflanzen gewöhnlich 3 g aus 1 kg trockenen Krautes; bei chlorophyllreichen Blättern erheblich mehr, z. B. haben 100 kg Brenn-

nesseln 424 g Phäophytin geliefert (ohne Verwendung der Mutterlaugen).

Eine Abänderung dieses Verfahrens bestand in der Bereitung der Rohchlorophyllösungen mit Hilfe von Perkolatoren (Kap. III, Abschn. 2a); anfangs wurden die Blattmehle in den Perkolatoren 24—48 Stunden lang maceriert und dann perkoliert. Der „Fällungskoeffizient", d. i. der Quotient

$$\frac{\text{als Phäophytin gefälltes Chlorophyll}}{\text{gelöstes Chlorophyll}},$$

erwies sich aber günstiger bei Schnellperkolaten, die ganz ohne Macerieren hergestellt waren. So gewannen wir aus 44 kg Brennnesselmehl, womit vier Perkolatoren beschickt wurden, 208 g reines Phäophytin, d. i. 4,8 g aus 1 kg.

Neues Verfahren [1]).

Nach unseren vergleichenden Versuchen über die Extraktionsmethoden ist das beste Verfahren die rasche Extraktion der Blattmehle auf der Nutsche mit wasserhaltigen Lösungsmitteln:

1. Aceton mit 10—20 Volumprozent Wasser.
2. Alkohol mit 10 Volumprozent Wasser.

Dabei wird mit niedriger Schicht des Pflanzenmaterials gearbeitet, damit das Chlorophyll aus der gebildeten konzentrierten Lösung nicht im Blattmehl an zweiter Stelle sich wieder absetzen kann.

Die so gewonnenen Extrakte ermöglichen große Verbesserungen der Phäophytingewinnung.

Das Phäophytin von Willstätter und Hocheder war reine Chlorophyllsubstanz, d. h. frei von Fett, Wachs und anderen farblosen oder farbigen Beimischungen. Allein das Chlorophyll der angewandten Extrakte war in vielen Fällen verändert [2]), namentlich bei Verarbeitung gewisser Pflanzenmehle (Brennesseln) allomerisiert. Daher lieferten manche Phäophytinpräparate bei der Spaltung nicht allein die normalen Derivate Phytochlorin e

[1]) Unveröffentlicht.
[2]) Abh. XIV.

und Phytorhodin g, sondern daneben schwach basisches Chlorin und Rhodin. Ferner war die Phytolestergruppe bei der längeren Berührung des Extraktes mit dem Blattmehle der Alkoholyse ausgesetzt. Die Zusammensetzung des Phäophytins war also nicht konstant.

Die nach dem neuen raschen Verfahren mit wasserhaltigen Lösungsmitteln gewonnenen Extrakte enthalten das Chlorophyll in unverändertem Zustand und liefern daher Phäophytin, das aus einem reinen Gemisch der Phytylphäophorbide a und b in ihrem natürlichen Verhältnis besteht und durch Verseifung nur die zwei normalen Spaltungsprodukte gibt. Ein weiterer Fortschritt besteht darin, daß diese neuen Extrakte beim Ansäuern mit Salzsäure sofort reines Phäophytin liefern, das keiner Umfällung oder Umscheidung bedarf. Es wäre mit den Extrakten der älteren Methoden unmöglich, durch Ansäuren mit Salzsäure (statt Oxalsäure) reines Phäophytin abzuscheiden; die Umfällung war nicht zu vermeiden.

Die Aceton- und die Alkoholextrakte nach der neuen Methode können zur Verarbeitung auf Phäophytin dienen.

Mit Aceton erhalten wir bei der Extraktion die größten Chlorophyllausbeuten (95%), aber bei direktem Ansäuern sehr unreines Phäophytin. Die Acetonextrakte sind daher auf Phäophytin zu verarbeiten durch Ausfällen des Rohchlorophylls auf Talk beim Verdünnen mit Wasser (Kap. V, Abschn. 3), Wiederausziehen des Chlorophylls aus dem Talk mit 92-(nicht höher)prozentigem Alkohol und Ansäuern.

Besser geeignet für die Verarbeitung auf Phäophytin durch direktes Ansäuern sind die alkoholischen Extrakte.

Den Einfluß, welchen verschieden große Zusätze von Wasser zum angewandten Alkohol auf die Ausbeute und Reinheit des Phäophytins ausüben, zeigt folgendes Beispiel:

Je 1 kg techn. Brennesselmehl (Chlorophyllgehalt 5,1 g) wurde nach dem Nutschenverfahren mit 95-, 90- und 85 volumprozentigem Alkohol unter ganz gleichen Bedingungen (nach dem Verfahren von Kap. III, Abschn. 2) extrahiert und die Auszüge (je 0,9 l) mit Salzsäure gefällt.

Alkohol	95%	90%	85%
Gehalt an Chlorophyll	4,28 g	5,04 g	4,67 g
Ausbeute an Phäophytin	3,15 „	3,70 „	3,20 „
Reinheit des Phäophytins	90%	100%	100%

Aus dem Vergleich ergibt sich das folgende Verfahren für die Gewinnung von Phäophytin.

Das in größerem Maßstab verfügbare Ausgangsmaterial war das mittelfein gemahlene Brennesselkraut der Drogengroßhandlungen („techn. Brennesseln"), deren Chlorophyllgehalt $^1/_2$—$^2/_3$% betrug.

Auf unsere niedrigen Steinzeugnutschen von 50 cm Durchmesser füllen wir unter Saugen mit Maschinenvakuum trocken je 4 kg Blattmehl, die eine Schicht von nur 4—5 cm Höhe bilden, auf. Ohne weiter zu saugen, lassen wir von 90prozentigem Alkohol 2 l in das Mehl einsickern, dann wird der Vakuumhahn geöffnet und weitere 4 l Lösungsmittel in einigen Portionen aufgefüllt. Das Mehl ist in 20 Minuten fertig extrahiert. Das Filtrat (4 l) saugt man zur Befreiung von mitgerissenen feinen Mehlpartikeln noch auf einer kleinen Nutsche durch eine mehrfache Schicht Filtrierpapier.

Zwei nebeneinander fertiggestellte Chargen vereinigen wir und versetzen sie sofort mit 160 ccm 10prozentiger alkoholischer Salzsäure. Der Farbumschlag erfolgt rasch und zugleich beginnt die Ausscheidung des Phäophytins in feinen Körnchen, die in einer Stunde vollständig ist. Nach dieser Zeit dekantieren wir vorsichtig die braungelbe klare Mutterlauge, worin sich bei längerem Stehen nur eine geringe, weniger reine Fällung bildet, von dem dichten Niederschlag, saugen ihn auf der Nutsche scharf ab und waschen, die Bildung von Rissen vermeidend, dreimal mit je 100 ccm 96prozentigem Sprit nach. Abgepreßt und noch alkoholfeucht läßt sich das Präparat sehr leicht zerkleinern, trocken nur äußert schwer. Wir schneiden es deshalb noch feucht mit scharfen Silberspateln in die für die weitere Verarbeitung, namentlich die Verseifung mit alkoholischer Lauge, zweckmäßigen kleinen Partikel und trocknen das Präparat in großen Vakuumexsiccatoren aus Steinzeug mit Lochplatten aus demselben Material.

Wir erzielen einen Fällungskoeffizienten von 0.75 bis 0.85 und aus 1 kg Blattmehl eine Ausbeute von 3,6—5 g Phäophytin, das keiner weiteren Reinigung bedarf.

Ein Arbeiter bewältigt im Laboratorium täglich 40—48 kg mit einem Ertrag von 180—250 g Phäophytin; die Mutterlauge liefert bei der Rektifikation den Alkohol 93 volumprozentig mit einer Ausbeute von 80% zurück.

Erheblich besser als mit dem käuflichen Brennesselkraut war die Phäophytinausbeute bei Verarbeitung selbstgesammelter Brennesselblätter von gutem Chlorophyllgehalt.

Es ist zweckmäßig, von dem chlorophyllreicheren Material nur je 2 kg in die große Nutsche zu füllen und zur Extraktion die doppelte Menge von 90prozentigem Alkohol, also 6 l, anzuwenden. Der Extrakt (4,4 l) wurde entsprechend seinem größeren Volumen mit mehr Salzsäure versetzt, z. B. mit 100 ccm 15prozentiger alkoholischer Säure und nach nur einer Stunde filtriert.

Wir erhielten sehr reines Phäophytin in einer Ausbeute von 12,9 g und, wie die folgenden Zahlen zeigen, in einem günstigen Verhältnis zum Chlorophyllgehalt der Brennesseln.

Chlorophyll in 1 kg Brennesseln: 8,6 g;

Chlorophyll im Extrakt aus 1 kg Brennesseln: 7,75 g; Extraktionskoeffizient[1]) = 0,90;

Phäophytin aus 1 kg Brennesseln: 6,45 g; Fällungskoeffizient = 0,83;

Ausbeute = 0,90 . 0,83 = 75% der Theorie.

Wir haben für andere Zwecke noch bessere Ernten von Brennesselblättern mit einem Chlorophyllgehalt von 10 g im Kilogramm verarbeitet; sie würden eine Ausbeute von 8 g Phäophytin ermöglichen.

4. Beschreibung[2]).

Das Phäophytin wird in aschefreiem Zustand gewonnen; Darstellungen in größtem Maßstabe gaben 0,04%, im kleinen noch weniger Asche.

[1]) Man kann so den Quotienten aus extrahiertem und extrahierbarem Farbstoff bezeichnen.

[2]) Abh. III; zum Teil Unveröffentlichtes.

Die Reinheit der Präparate wird durch colorimetrischen Vergleich mit einem ihrem Komponentenverhältnis entsprechenden Gemisch der Methylphäophorbide a und b geprüft (Kap. IV, Abschn. 1b). Ihrem Farbwert nach sollen die im großen hergestellten Präparate ohne Reinigung zwischen 98- und 100 prozentig sein. Sie enthalten also keine farblosen Beimischungen.

Gelbe Begleiter verraten sich selbst in Spuren beim Behandeln der ätherischen Lösung mit methylalkoholischem Kali; dabei soll sich der Äther nur in sehr geringem Maße oder gar nicht gelb anfärben.

Auf dieselbe Weise wird die Phasenprobe angestellt; die Phase ist braun und schlägt bald in Olivgrün bis Grün um, je nach der Konzentration der Alkalilauge.

Bei der Spaltungsprobe, die durch Eintragen einer konzentrierten Pyridinlösung des Phäophytins in siedende methylalkoholische Kalilauge und Kochen während einer halben Minute ausgeführt wird, entstehen nur die beiden normalen Derivate Phytochlorin e und Phytorhodin g, deren Verhältnis ungefähr 2,5 : 1 zu sein pflegt.

Ein so glattes Resultat war schwer zu erreichen, besonders bei der Verarbeitung des gewöhnlichen Ausgangsmaterials, der getrockneten Brennesseln, deren Extrakte außerordentlich zur Bildung von schwach basischen Verbindungen neigen. Das vollkommen reine Gemisch von Chlorophyllderivaten wird erst und nur dann erhalten, wenn man

1. die Pflanze rasch extrahiert;
2. den Extrakt sofort ansäuert;
3. die Spaltung unter genau ermittelten Bedingungen ausführt (Kap. IV, 2).

Die Bestimmung der Phytolzahl ergibt nun auch, daß die leicht angreifbare Estergruppe unversehrt ist. Viel leichter und empfindlicher prüft man mit der Basizitätsprobe auf eine Beimischung von phytolfreiem Phäophorbid, nämlich durch Schütteln der Ätherlösung mit 22 prozentiger Salzsäure. Sie nimmt den Phytolester nicht auf und färbt sich daher nur ganz schwach an. Hydrolysiertes und alkoholysiertes Phäophytin, das bei den alten

langsamen Extraktionsmethoden (Doppelextrakte, Perkolate) unvermeidlich beigemischt war, geht glatt in diese Säure über.

Phäophytin hingegen ist so schwach basisch, daß es erst 25 prozentige Salzsäure ein wenig anfärbt; 28—29 prozentige nimmt die reine Komponente a auf. In der starken Säure, rascher in ganz konzentrierter, wird das Phytol hydrolytisch abgespalten.

Sauere Eigenschaften besitzt das Phytylphäophorbid nicht.

Phäophytin verbindet sich leicht mit Metallsalzen zu intensivfarbigen, sehr beständigen Komplexverbindungen, weshalb bei seiner Darstellung die Berührung mit unedlen Metallen ausgeschlossen werden muß. Mit Ferrisalz entsteht sofort in der Kälte eine schön grünstichig blaue Lösung, die sehr schwach fluoresciert. Zinkacetat gibt eine schön blaugrüne, in der Durchsicht rote Flüssigkeit, die sich durch starke Fluorescenz auszeichnet. Kupferacetat verwandelt das Braun des Phäophytins auch in großer Verdünnung in intensives Grün; die Lösung fluoresciert nicht.

Phäophytin ist ein Wachs; es wird nicht in deutlich krystallisierter Form erhalten, bildet aber baumähnliche krystallinische Gebilde. Er ist blauschwarz gefärbt, in Lösung olivbraun und bei großer Schichtdicke in der Durchsicht rot. In heißem Alkohol ist es ziemlich schwer, in kaltem sehr schwer löslich und läßt sich nach Art des Umkrystallisierens daraus „umscheiden“[1]). In Äther löst es sich träge, aber beträchtlich, in Benzol sehr leicht, in Chloroform spielend, in Petroläther ist es fast unlöslich.

Konzentrierte Salpetersäure zerstört Phäophytin beim Kochen, auf der hellen Flüssigkeit schwimmt dann als farblose Ölschicht ein stickstoffhaltiges Derivat des Phytols.

Charakteristisch ist auch die Reaktion der ätherischen Phäophytinlösung mit konzentrierter Salpetersäure: beim Schütteln färbt sich der Äther blau, während die Säure nichts Gefärbtes aufnimmt; beim Waschen mit Wasser nimmt die ätherische Lösung wieder die ursprüngliche Olivfarbe an.

[1]) Ann. d. Chem. 354, 221 [1907].

XIV. Methode der Trennung und Bestimmung von Chlorophyllderivaten[1]).

1. Fraktionierung mit Salzsäure.

Da das Chlorophyll aus zwei Komponenten besteht und da jede leicht veränderliche Lactamgruppen enthält, so entstehen beim Abbau im allgemeinen Gemische von Spaltungsprodukten, für deren Trennung und Reinigung keine Methoden existiert haben und deren Erkennung anfangs sehr unsicher gewesen ist.

Diese hochmolekularen Substanzen besitzen oft gleiche, oft sehr ähnliche Zusammensetzung und zeigen in ihren Reaktionen, ihren Farberscheinungen, sowie im Verhalten gegen Lösungsmittel weitgehende Übereinstimmung. Solange solche Reaktionsprodukte gemischt vorliegen, ist ihre Krystallisation erschwert. Die übliche Untersuchungsweise derartiger Chlorophyllderivate, in den Händen vieler Forscher sogar die einzige Methode, war die Spektralanalyse, und zwar nicht die viel zu schwierige vollständige Beobachtung der Absorption, sondern nur die Feststellung der Maxima. Die Methode hat auf diesem Gebiete nicht vor den schwersten Irrtümern geschützt. Sie gibt, solange die Konstanten der reinen Stoffe nicht bekannt sind, wenig Aufschluß darüber, ob die Verbindungen einheitlich und rein sind oder ob sie in Gemischen vorliegen. Während die spektralanalytische Methode für manche Veränderungen und Zersetzungen reiner Substanzen einen übertriebenen Ausdruck gibt, ist sie gänzlich unanwendbar für kompliziertere Mischungen von Verbindungen, deren Auflösung in Angriff genommen werden soll.

---

[1]) Zum Teil nach Abh. I.

Sehr viele Abbauprodukte des Chlorophylls ändern beim Abdampfen der ätherischen Lösungen oder beim Umkrystallisieren oder beim Trocknen im Exsiccator ihre Farbe, also ihr Absorptionsspektrum wesentlich, und zwar oft nur infolge von sehr geringfügigen Änderungen in ihrem Molekül, wie z. B. durch Abspaltung von Wasser. So werden die Lösungen von Glaukophyllin, welche frisch wunderschön blau sind, beim Eindampfen und Wiederaufnehmen mit Äther mehr und mehr rhodophyllinähnlich, also rot. Spektroskopisch ist dieser Effekt viel größer als etwa der einer Verunreinigung durch Rhodophyllin. Bei der Charakterisierung der Chlorophyllderivate durch ihre Absorptionsspektren ist daher der Zustand der Präparate viel sorgfältiger zu berücksichtigen, als dies nach den Literaturangaben früher geschehen ist.

Bei aller Wichtigkeit der Absorptionsspektra für die Beschreibung der Chlorophyllderivate war daher die spektroskopische Methode doch nur selten wertvoll für die chemische Untersuchung, auch für die Arbeit, welche die Isolierung der Farbstoffkomponenten zum Ziele hatte; diese Einschätzung, die schon in der ersten Abhandlung ausgesprochen worden war, hat sich inzwischen oft bestätigt.

Die Untersuchung des Chlorophylls hat Willstätter gemeinsam mit W. Mieg eingeleitet mit einer von der Spektralanalyse unabhängigen Trennungs- und Untersuchungsmethode, die sich auf die eigentümliche basische Natur aller magnesiumfreien Chlorophyllderivate gründet.

Chlorophyll selbst ist weder Base noch Säure. Die mit Alkalien entstehenden Abbauprodukte, die Phylline, haben nur sauren Charakter; solange das Molekül komplex gebundenes Magnesium enthält, kann man es nicht mit sauren Agenzien berühren, ohne Zersetzung zu bewirken.

Durch Austritt des Magnesiums aus diesen Phyllinen werden die Porphyrine gebildet, Verbindungen von roter Farbe, die zugleich sauer und basisch reagieren. Sie sind Gegenstand der Anwendung des zu beschreibenden Verfahrens.

Die dem Chlorophyll noch näherstehenden Verbindungen, Phäophytin und die anderen Phäophorbide, sind bedeutend schwächer

basisch als die Porphyrine. Daher erfordern sie zur Lösung Salzsäuren von hoher Konzentration und unterliegen in diesen Lösungen sehr leicht Veränderungen, so daß die Salzsäuremethode von Willstätter und Mieg für sie anfangs nicht anwendbar war. Erst nachdem in den letzten Jahren diese Verseifungen bestimmter Estergruppen genau definiert worden waren, konnten sie selbst bei dem Arbeiten mit starken Säuren vermieden werden. Daher beruhen die Trennungen von:

Phäophytin in Phytylphäophorbid a und b	mit	Salzsäure	von	30%
der Methylphäophorbide a und b	„	„	„	17%
der freien Phäophorbide a und b	„	„	„	16%

auf derselben Methode und zählen zu ihren wichtigsten Anwendungen. Es handelt sich hier (wie im folgenden bei Phytochlorin e und Phytorhodin g), vor allem um Trennung analoger Phasen des Abbaus der beiden Chlorophyllkomponenten.

Beim Verseifen von Phäophorbiden, nämlich von verschiedenartigen Phäophytinpräparaten mit alkoholischem Kali treten zwei Reihen von Verbindungen auf, die zugleich schwach sauer und schwach basisch sind: die Phytochlorine, welche in indifferenten Solvenzien olivgrüne bis grüne, in saurer Lösung blaugrüne bis blaue Farbe zeigen und die Phytorhodine, die in saurer Lösung blau bis grün, in neutraler Lösung prächtig rot gefärbt sind.

Anfangs bildeten chlorophyllhaltige Extrakte das Material der Untersuchung, in denen mannigfache Veränderungen des Chlorophylls, die heute genau erklärbar sind, namentlich Allomerisationen, eingetreten waren. Daher entstand nicht einfach je ein Chlorin und ein Rhodin aus den zwei Komponenten, sondern eine ganze Schar von Verbindungen beider Gruppen. Auch sind Estersäuren beider Gruppen, nämlich Phytochlorine durch direkte Einwirkung von Alkalien auf chlorophyllhaltige Extrakte, Phytorhodine durch Behandlung von Chlorophyllinen mit alkoholischer Chlorwasserstoffsäure erhalten worden.

Von der Reihe der Phytochlorine sind 7 Repräsentanten, die Chlorine a bis g, von der Reihe der Phytorhodine 10 Glieder, nämlich die Rhodine a bis k beschrieben worden. Von allen diesen

Verbindungen hat nur je eine besondere Wichtigkeit als das bei dem glattesten Abbau entstehende, daher als normal bezeichnete Spaltungsprodukt jeder Chlorophyllkomponente, nämlich Phytochlorin e und Phytorhodin g. Die meisten anderen Chlorine und Rhodine sind von geringem Interesse als Chlorophyllderivate, sie werden nur als diejenigen Beispiele angeführt, mit welchen die Trennungs- und Bestimmungsmethode ausgearbeitet und beschrieben worden ist.

Die Phytochlorine und Phytorhodine sind in Wasser unlöslich, in organischen Solvenzien mehr oder weniger löslich. Als schwache Säuren lösen sie sich in Alkalien, auch in Ammoniak und Bicarbonat und werden von diesen aus ätherischer Lösung quantitativ aufgenommen. Sie enthalten nur esterifizierbare saure Gruppen, ihre Ester sind nämlich alkaliunlöslich. Alle sind schwache Basen, deren Salze durch Wasser vollständig zerlegt werden.

Dabei sind ihre basischen Eigenschaften ungleich differenzierter als ihre sauren und zeigen Unterschiede und Abstufungen, wie sie bei schwachen organischen Basen noch nicht beobachtet worden sind.

Um aus ätherischer Lösung in Salzsäure, die im Überschusse angewandt wird, überzugehen, erfordern diese Verbindungen Säure von bestimmter Konzentration. Schwefelsäure und gar Phosphorsäure sind praktisch weniger gut anzuwenden, weil die nötigen Konzentrationen recht hoch sind. Für jede einzelne Substanz sind Grenzen charakteristisch, so zwar, daß Salzsäure bis zu einer gewissen Stärke der ätherischen Lösung nichts oder nur Spuren, eine etwas konzentriertere einen großen Teil, endlich eine noch stärkere so gut wie alles bei einmaligem Durchschütteln entzieht. Die Konzentration der ätherischen Lösung und die Menge der Salzsäure üben selbstverständlich auf das Resultat einen erheblichen Einfluß aus, den man bei der praktischen Anwendung wohl berücksichtigen muß. Natürlich rücken die Grenzzahlen, je stärker die Basen sind, desto enger zusammen, wenn man nicht die relative Konzentration der Chlorwasserstoffsäure, sondern den Prozentgehalt der Salzsäure in Betracht zieht. Über die Grenzen bei den ersten Phytochlorinen orientiert folgende Tabelle:

Phytochlorin	Spuren gehen in Salzsäure von	Geht sehr reichlich in Salzsäure von	Geht fast vollständig in Salzsäure von
a	3,5	6,5	7,5
b	1,5	3,5	5,0
c	0,5	1,5	2,0
d	0,15	0,5	1,0

Den Beobachtungen liegen folgende normale Arbeitsbedingungen zugrunde: 1—2 ccm ätherische Lösung, die 0,1 g Substanz in 100 ccm enthält, werden mit demselben Volumen Salzsäure einmal durchgeschüttelt. Mit solchen Lösungen wurde für die Phytochlorine a und b die Verteilung zwischen Äther und Salzsäure quantitativ untersucht.

Drei Portionen von je 0,100 g wurden in je 100 ccm Äther gelöst und mit je 100 ccm Salzsäure 5 Minuten lang durchgeschüttelt. Dann trennte man die Schichten und dunstete die mit wenig Wasser gewaschene ätherische Lösung vorsichtig ein; der Rückstand wurde im Vakuum über Schwefelsäure zur Konstanz getrocknet. Die nachstehende Tabelle verzeichnet die von den verschiedenen Salzsäuren aufgenommenen Anteile.

Phytochlorin	Prozentgehalt der Salzsäure	Aufgenommene Substanz in %
a	8	84,1
a	7,0	73,8
a	6,0	60,7
b	5,5	74,4
b	4,0	54,7
b	2,5	26,4

Auf der verschiedenen Basizität beruht die Möglichkeit der Trennung. Das Beispiel der Phytochlorine a und b diene wiederum zur Beschreibung. Man erhält sie gemengt mit schwächer basischen Substanzen. Schüttelt man die ätherische Lösung[1]) wiederholt mit 4prozentiger und 7prozentiger Salzsäure durch und wäscht man die beiden sauren Lösungen gründlich mit Äther, um die in jedem

[1]) Es ist natürlich nicht notwendig, mit der Lösung des Gemisches zu arbeiten, aber die Anwendung in gepulverter Form führt schwerer zum Ziele.

Fall mit aufgenommenen schwächeren Basen wieder herauszuholen, so gelingt es, einen ansehnlichen Teil von a und b in ziemlich reinem Zustande zu isolieren.

Viel besser ist eine zweite Ausführungsweise der Fraktionierung. Ihr Prinzip besteht darin, die Verbindungen in der Reihenfolge ihrer Basizität mit so schwachen Säuren zu extrahieren, daß von den nächst schwächeren Basen nur minimale Spuren gelöst werden können. Natürlich muß man die stärksten Säuren anwenden, die dieser Bedingung noch genügen. So isoliert man im gegebenen Falle Phytochlorin b mittels 3prozentiger Salzsäure. Da diese aber b nicht quantitativ aus dem Äther herausholt, ist es notwendig, danach durch wiederholtes Ausschütteln mit 4,5prozentiger Säure eine Mittelfraktion abzutrennen, ehe man an die Extraktion von a geht. Hierfür dient nunmehr 6prozentige Säure. Auch diesmal sind die (3- bzw. 6prozentigen) salzsauren Lösungen der Phytochlorine mit Äther zu waschen. Dann erhält man schon bei der einmaligen Fraktionierung die Substanzen in reinem Zustande.

Etwas abgeändert wird das Verfahren, um die Chlorophyllderivate vollkommen zu reinigen, wenn sie schon in ziemlich reinem Zustande vorliegen, beispielsweise so, wie sie bei der ersten, hinsichtlich der Ausbeute vorteilhafteren Art des Trennungsverfahrens erhalten wurden. So löst man Phytochlorin a in Äther auf, wäscht die Lösung wiederholt mit 4,5prozentiger Salzsäure durch und extrahiert dann die Base mit 6,5prozentiger Säure.

Auf dieselbe Weise werden dann die schon gereinigten Substanzen wieder in Fraktionen zerlegt und deren Identität bewiesen.

Anwendbar ist die Methode gerade bei diesen gefärbten Stoffen. Es ist nur hier ein leichtes, für jeden Fall die zur Isolierung geeigneten Säuren auszuprobieren und nach der Farbintensität der Auszüge den extrahierten Anteil zu schätzen. Dabei ist es wichtig, verschiedene Auszüge einer Substanz hinsichtlich der Farbnuance zu vergleichen, um zu beurteilen, ob sie einheitlich ist.

Eine ähnliche Trennung der Chlorophyllderivate mit Alkalien ist nicht möglich, da ihre Alkalisalze im allgemeinen weit weniger hydrolytisch gespalten werden, aber man kann, allerdings viel weniger gut, mit Hilfe von Alkalien nach den gemeinhin üblichen

Methoden fraktionieren. So wurde z. B. bei der Reinigung von Phytorhodin f, dem nach einer rohen Fraktionierung mit Salzsäure noch recht ähnlich basische Verbindungen beigemengt waren, derart verfahren, daß man den zur Neutralisation erforderlichen Betrag von Alkali sehr verdünnte, in eine Reihe von Portionen teilte und mit diesen sukzessive die ätherische Lösung ausschüttelte. Dann wurden die wieder in Äther gebrachten Fraktionen nach ihrer Farbe beurteilt.

Eine solche Ergänzung der in saurer Lösung ausgeführten Fraktionierung ist nur ausnahmsweise nötig gewesen. Fast stets erhielten wir dabei die Verbindungen in einheitlichem Zustande, so daß sie ohne weitere Reinigung aus ätherischer Lösung gut krystallisierten. Die farblosen Verunreinigungen der Chlorophyllderivate, wie Fette, Wachse, die sich durch bloßes Umkrystallisieren schwer abtrennen lassen, sind durch das Aufnehmen mit verdünnter Säure beseitigt.

Nicht weniger wertvoll als für die Trennung ist die Fraktionierungsmethode für die qualitative Analyse, nämlich die Bestimmung der Abkömmlinge des Chlorophylls. Bei allen möglichen Reaktionen, die zu einigermaßen basischen Stoffen führen, kann man die Reaktionsprodukte schon im Reagensglastropftrichter untersuchen, indem man die ätherischen Lösungen mit Salzsäuren von abgestufter Konzentration durchschüttelt. Man beobachtet, ob die Produkte Gemische oder einheitlich sind und vermag sie nach ihrer Basizität einzuordnen. Die geringsten Veränderungen der beschriebenen Chlorophyllderivate beim Trocknen in der Wärme oder beim Aufbewahren wurden dadurch auffällig.

Um die beschriebene Methode zur Untersuchung der Phylline anzuwenden, zersetzt man dieselben mit Säure und prüft die entstehenden Porphyrine; aus der Basizität eines Porphyrins und aus seiner Einheitlichkeit kann man auf das zugrunde liegende Phyllin zurückschließen.

2. Die Salzsäurezahl.

Die in den Beispielen für die Salzsäuremethode angeführten Phytochlorine a, b, c, d haben keine Bedeutung für den Abbau

des Chlorophylls. Die wichtigeren magnesiumfreien Chlorophyllderivate sind in den folgenden drei Tabellen angeführt, die über ihre basischen Eigenschaften orientieren.

Die Konzentration der Salzsäure, die unter den üblichen Arbeitsbedingungen eine reichliche Menge der Substanz aus Äther extrahiert, ist für die präparativen Zwecke so bedeutsam, daß sie besonders gekennzeichnet werden soll. Wir nennen daher in den Tabellen und im Folgenden „Salzsäurezahl" den Prozentgehalt derjenigen Säure, die einem ihr gleichen Volumen ätherischer Lösung beim Durchschütteln ungefähr zwei Drittel der gelösten Substanz entzieht.

Zweckmäßig wendet man für diese Prüfung 0,02 g in 100 ccm Äther an oder, wenn die Löslichkeit geringer ist, eine gesättigte ätherische Lösung.

Die Salzsäurezahl läßt sich im Reagensglas hinlänglich genau ermitteln. Sie gibt einen Ausdruck für die den Chlorophyllderivaten eigentümliche, bei anderen Verbindungen noch nicht beobachtete Erscheinung, daß das Verhältnis, in welchem sich die Base zwischen gleichen Volumen Äther und wässeriger Säure verteilt, mit der Säurekonzentration außerordentlich stark veränderlich ist und daß daher eine Variation des Säuregehaltes von wenigen Prozenten ausreicht, um den Wert des Verhältnisses von annähernd Null auf nahezu Unendlich zu treiben. Infolgedessen ist es für die Beschreibung der basischen Eigenschaften unerheblich, daß hier zumeist nicht eine genaue Verteilung zwischen Äther und Salzsäure, sondern nur der reichliche Übergang aus Äther in die Säure angegeben wird.

1. Phäophorbide.

	Spuren gehen in Salzsäure von	Salzsäurezahl	Geht fast vollständig in Salzsäure von
Phäophytin a	25	29	32
Phäophytin b	30	35	—
Methylphäophorbid a	13	16	18
Methylphäophorbid b	17	21	23
Phäophorbid a	12	15	17
Phäophorbid b	16	19½	22

2. Phytochlorine und Phytorhodine.

	Spuren gehen in Salzsäure von	Salzsäure-zahl	Geht fast vollständig in Salzsäure von
Phytochlorin e	1/2	3	4—5
Phytochlorin f	7	10	12
Phytochlorin g	8	10—11	12—13
Phytorhodin g	6	9	11
Phytorhodin i	11	15—16	20
Phytorhodin k	9	14—14 1/2	18

3. Porphyrine.

	Spuren gehen in Salzsäure von	Salzsäure-zahl	Geht fast vollständig in Salzsäure von
Glaukoporphyrin	2	4—5	6
Cyanoporphyrin	1	4	5
Rhodoporphyrin	2	3	4
Erythroporphyrin	—	—	—
Rubiporphyrin	2 1/2	4 1/2	6 1/2
Pyrroporphyrin	1/2	1 1/2	3
Phylloporphyrin	1/10	3/4	1 1/2
Ätioporphyrin	1	3	4

Eine weitere Anwendung der Bestimmungsmethode von Willstätter und Mieg war bei den Verbindungen von Erfolg, welche durch die Enteisenung des Hämins entstehen. Es handelt sich nach Willstätter und M. Fischer [1]) in der Hämatoporphyringruppe um eine Reihe einander sehr nahe stehender Verbindungen, deren Definition und Unterscheidung wichtig ist. Sie gelingt mit Hilfe der Salzsäurezahlen, und zwar schon mit den geringsten Mengen, während sonst kein Mittel für diesen Zweck bekannt ist.

4. Die Porphyrine aus Hämin.

	Spuren gehen in Salzsäure von	Salzsäure-zahl	Geht fast vollständig in Salzsäure von
Hämatoporphyrin	0,033	0,1—0,15	0,4
Häminoporphyrin	0,033	0,15	0,4
Hämidoporphyrin	0,2	1,0	2,5
Hämoporphyrin	0,15	0,75	2,0
Mesoporphyrin	0,5	1—1,5	3,0
Ätioporphyrin	1,0	3,0	4,0

[1]) Unveröffentlicht.

3. Die Verteilungszahl[1]).

Die Salzsäurezahl kennzeichnet das basische Verhalten nicht vollständig, indessen für die Erkennung vieler Chlorophyllderivate hinreichend; für die Unterscheidung der einander in der Basizität nahestehenden Verbindungen ist eine genauere Zahl erforderlich.

Das Verhalten einer solchen basischen Verbindung würde vollkommener beschrieben mit ihrer Verteilung als Funktion des Volumenverhältnisses von Äther zu Säure, und zwar für verschiedene Säurekonzentrationen; namentlich wäre für die Konzentration der Salzsäurezahl die Verteilung der Base zwischen Säure und Äther in ihrer Abhängigkeit vom Volumverhältnis der beiden Schichten zu ermitteln. Aus dieser Verteilung könnte die Salzsäurezahl abgeleitet werden.

Für den genaueren Ausdruck des basischen Charakters mittels einer Konstanten hat es genügt, die Verteilung der Basen für ein einziges Volumverhältnis von Äther zu Salzsäure, für eine Salzsäurekonzentration und eine Konzentration der ätherischen Lösung zu ermitteln. Aus praktischen Gründen wählen wir zwar ungefähr dieselbe Stärke der Säure, aber nicht das Volumverhältnis 1 : 1 wie bei der Salzsäurezahl, sondern das Volumverhältnis 1 Salzsäure: 10 Äther und eine sehr geringe Konzentration der Substanz im Äther.

Den Bruchteil einer Substanz in Prozenten, der in Salzsäure von bestimmter Konzentration unter gewissen Bedingungen aus ätherischer Lösung übergeht, bezeichnen wir als Verteilungszahl.

Diese Bedingungen sind: 3 mg Substanz in 1 l Äther, 100 ccm Salzsäureschicht.

Die Salzsäurekonzentration kann natürlich nicht nur die von der Salzsäurezahl ausgedrückte sein, sondern man wird für Vergleiche öfters irgend eine andere, zur Extraktion anwendbare Säure wählen. Wir wenden nämlich für den Vergleich der einander nahestehenden Verbindungen eine und dieselbe Salzsäure an, z. B. $^1/_2$prozentige für Phylloporphyrin und Pyrroporphyrin, deren Salzsäurezahlen $^3/_4$ und $1^1/_2$ sind.

---

[1]) Unveröffentlicht.

Während die Salzsäurezahl die für die Extraktion einer Verbindung zweckmäßige Säurekonzentration angibt, zeigt die Verteilungszahl den Unterschied in den basischen Eigenschaften auch einander ähnlicher Verbindungen deutlich und ermöglicht die sichere Identifizierung eines Chlorophyll- odes Häminderivates.

Bestimmung: Von der gewichtskonstanten Substanz werden 3 mg in einigen Kubikzentimeter ätherhaltiger starker Salzsäure gelöst und durch Neutralisieren mit Ammoniak in 1 l Äther übergeführt, dem zur Erhöhung des Lösungsvermögens 50 ccm Sprit zugesetzt sind. Der Alkohol wird mit 5 l destillierten Wassers weggewaschen und durch Zusatz von Äther das Volumen der Lösung auf 1 l gebracht. Mit 100 ccm der geeigneten Salzsäure, deren Prozentgehalt durch Titration oder mit dem Aräometer bestimmt worden, schütteln wir nun die ätherische Lösung eine Minute lang tüchtig durch; die Volumenvermehrung (ca. 10 ccm) der salzsauren Schicht durch Aufnahme von Äther wird gemessen und berücksichtigt.

Für die colorimetrische Bestimmung der extrahierten Substanz kann a) die salzsaure Lösung des im Äther hinterbliebenen Anteils oder besser b) eine neue Vergleichslösung derselben Substanz dienen.

Im ersteren Fall extrahieren wir den im Äther hinterbliebenen Rest mit stärkerer Salzsäure und verdünnen mit ätherhaltigem Wasser bis auf die Säurekonzentration des ersten Auszugs.

Im zweiten Fall lösen wir weitere 3 mg der Substanz in soviel ätherhaltiger, konzentrierter Salzsäure (20—35 prozentig, je nach der Löslichkeit), daß beim Verdünnen mit ätthergesättigtem Wasser bis aufs Volumen des zu bestimmenden Auszugs eine Salzsäure vom Prozentgehalt des letzteren entsteht.

Sind die Colorimeterschichten der Versuchslösung h_1 und der Vergleichslösung (nach b) h_2, so ist die Verteilungszahl $\frac{h_2}{h_1} \cdot 100$.

Beispiel: Die Verteilungszahl diente zur Prüfung eines durch Abbau von Hämin gewonnenen neuen Porphyrins, des Hämoporphyrins, auf seine Einheitlichkeit. Es ist durch Ausziehen mit verdünnten Salzsäuren aus Äther in vier Fraktionen zerlegt worden.

Diese stimmten in den Verteilungszahlen genau überein, waren also identisch.

Eine andere Anwendung der Verteilungszahlen besteht im Vergleich verschiedener Darstellungen einer Substanz. Die folgende Tabelle macht dies ersichtlich und gibt zugleich Anhaltspunkte für die Differenzen bei der Bestimmung.

Verteilungszahlen einiger Chlorophyll- und Hämin-derivate.

Substanz	Darstellung	Salzsäure-konzentration in %	Verteilungszahl
Phylloporphyrin	aus Phytochlorin e	0,5	33,4
	aus Phytorhodin g	0,5	37,1
	Nebenprodukt von Rhodophyllin (Präp. von Willstätter und Fritzsche 1909)	0,5	35,7
	aus Methylchlorophyllid b	0,5	34,6
Pyrroporphyrin	aus Chlorophyll a über Pyrrophyllin	0,5	4,8
	aus Phytorhodin k	0,5	3,8
	aus Phytorhodin i	0,5	4,4
Glaukoporphyrin	aus Glaukophyllin	3,5	15,4
Rhodoporphyrin	aus Rhodophyllin	3,5	18,1
Rubiporphyrin	aus Rubiphyllin	3,5	7,4
Phytorhodin k	aus allomerem Chlorophyll b	15,0	7,8
Phytorhodin i	aus allomerem Chlorophyll b	15,0	4,2
Mesoporphyrin	aus Mesohämin	0,5	12,9
Mesoporphyrin	nach Nencki und Zaleski	0,5	11,8
Phonoporphyrin	aus Hämatoporphyrin	0,5	23,5
Ätioporphyrin	aus Chlorophyll	3,0	40,2
Ätioporphyrin	aus Hämin	3,0	43,1

XV. Die Phäophorbide a und b.

1. Trennung des Phäophytins in die Komponenten.

Die isolierten Chlorophyllkomponenten liefern durch Spaltung mit Säure ihre reinen magnesiumfreien Derivate. Für diese Bildung ist es nicht nötig, die Chlorophyllpräparate zuerst abzuscheiden, man kann ebensogut die nach Willstätter und Isler fraktionierten Chlorophylllösungen anwenden[1]). Zum Beispiel wird eine petrolätherische Lösung des Chlorophylls a, wie sie beim Überführen des Chlorophylls in 95prozentigem Methylalkohol hinterbleibt, von beigemischtem b durch Waschen mit 90- und 95prozentigem Holzgeist gänzlich befreit und dann mit alkoholischer Oxalsäure zersetzt. Beim Einengen und wiederholten Abdampfen mit Alkohol wird das Rohphäophytin a in filtrierbarer Form abgeschieden.

Die Darstellung der Phytylphäophorbide aus den Chlorophyllkomponenten ist umständlich und kostspielig; viel wichtiger ist die Fraktionierung des Phäophytins nach der Methode von Willstätter und Mieg.

Diese Methode haben Willstätter und Isler[2]) für die Isolierung von Phäophytin b angewandt, während sie die Komponente a, welche durch die Extraktion mit der erforderlichen starken Salzsäure leicht verseift wird, nicht als solche isolieren konnten, sondern auf freies Phäophorbid a verarbeiteten. Wir haben das Verfahren so verbessert, daß es die beiden Phytylverbindungen unversehrt und sogar in größerem Maßstab zu gewinnen erlaubt.

---

[1]) Ann. d. Chem. 390, 321, 323 [1912].
[2]) Ann. d. Chem. 390, 324 [1912].

Neues Verfahren [1]).

Die Fraktionierung des Phäophytins erfordert mindestens 27prozentige Salzsäure. Diese hochprozentige Säure nimmt viel Äther auf und erhitzt sich dabei sehr stark, so daß sich die Hydrolyse des in die Säure gehenden Anteils nicht vermeiden läßt. Wir verwenden nun eine zuvor mit Äther gesättigte und abgekühlte Salzsäure, und zwar, um die Fraktionierung rasch durchführen zu können, eine stärkere. Infolge der Vorbehandlung der Säure mit Äther kann eine konzentriertere Phäophytinlösung der Trennung unterworfen werden.

Die Extraktion der Komponente a geschieht mit 30prozentiger, die Reinigung von b mit 31prozentiger Salzsäure, die wir in folgender Weise in äthergesättigtem Zustand bereiten.

7 l konzentrierte Salzsäure (spez. Gewicht 1,19, d. i. 37,5% bei 15°) kühlen wir von 15° durch Eintragen von Eisstücken und Umrühren auf 0—1° ab. Gerade wenn diese Temperatur erreicht ist, zeigt das Aräometer 31,5% Chlorwasserstoff an oder beim Erwärmen einer Probe auf 15° genau 30%. Die kalte Säure wird in drei Portionen mit dem gleichen Volumen Äther geschüttelt. Sie nimmt 90 Volumprozente Äther auf und erwärmt sich dabei auf 28—29°.

Im Fall der 31prozentigen Säure wird die 37prozentige von 15° durch Zusatz von Eisstücken nur auf 2—3° gebracht. Dann ist die Aräometerangabe 32,3%, d. i. soviel als 31 beim Erwärmen einer Probe auf 15°.

Diese zweite Säure nimmt beim Sättigen mit Äther 93 Volumprozent auf.

Die Salzsäureäthermischungen werden für die Anwendung wieder auf 0° abgekühlt.

12 g Phäophytin, dessen Komponentenverhältnis 2,5 ist, werden zerkleinert mit 2 l Äther bis zur Auflösung an der Maschine geschüttelt. Zuerst empfiehlt es sich, noch in der Schüttelflasche eine Reinigung durch Waschen der Ätherlösung mit 100 ccm 22,5prozentiger Salzsäure vorzunehmen, sie fällt oft eine Spur

[1]) Unveröffentlicht.

Verunreinigung aus, die Emulsionen verursacht, und entfernt zugleich etwas beigemischtes alkoholysiertes Phäophytin. Wir filtrieren die gesamte Flüssigkeit in einen Scheidetrichter, lassen die salzsaure Schicht ab, und ergänzen das Äthervolumen auf 3 l.

Dann erfolgt die Trennung durch eine Reihe von Ausschüttelungen mit der beschriebenen 30prozentigen Säure. Die einzelnen mit je 2 l Säure unter vorsichtigem Durchschütteln erhaltenen tiefblauen Auszüge kommen jeder für sich, auch wenn er von Äther getrübt ist, so schnell als möglich in einen zweiten mit $^1/_2$ l Äther beschickten Scheidetrichter und werden durch kurzes Umschütteln von ein wenig beigemischter Komponente b befreit. Dann läßt man die saure Schicht sofort in einen dritten Scheidetrichter mit viel Wasser fließen, wobei die Komponente a vollständig in den sich reichlich abscheidenden und zur Lösung hinreichenden Äther geht.

Nach jedem Auszug mit der 30prozentigen Salzsäure wird das Volumen der Ätherlösung mit $^1/_2$ l ergänzt, und zwar mit dem etwas b enthaltenden Waschäther des vorigen Auszuges; die angewandte Säure hat nämlich noch 25 Volumprozent Äther geschluckt, da sie nur bei etwa 30° mit Äther gesättigt worden.

In derselben Weise haben wir mit raschem Waschen, wobei der Waschäther immer ärmer an a und immer mehr braun wird, und sofortigem Verdünnen achtmal ausgezogen und die Ätherlösung der Komponente a, im ganzen 5—6 l, gesammelt. Sie enthält nur sehr wenig freies Phäophorbid, das man durch Waschen mit $^1/_2$ l 25prozentiger Salzsäure leicht entfernen kann.

Die hinterbleibende ätherische Lösung der Komponente b, ungefähr 3 l, ist noch unrein. Sie muß 4—5mal mit je 1 l der vorbereiteten 31prozentigen Säure ausgeschüttelt werden. Die ersten Waschflüssigkeiten sind noch blaugrün, die letzteren sind fast rein grün und geben beim Überführen in Äther schon eine rötlich braune Lösung, deren Phasenprobe braunrot bis rot ausfällt. Das Volumen der b-Lösung wird nicht ergänzt, es beträgt am Ende etwa 2 l. Die Farbe ist tief rotbraun, die Phase mit methylalkoholischem Kali rein rot; freies Phäophorbid b wird von der kalten Säure nicht gebildet.

Schließlich waschen wir die ätherischen Lösungen der beiden Komponenten mit Wasser bis zum Verschwinden der saueren Reaktion und dampfen nach kurzem Trocknen mit Natriumsulfat auf je $^1/_2$ l ein. Dann filtrieren wir nochmals in einen $^3/_4$ l-Kolben, dampfen zuletzt unter Umschwenken auf etwa 100—150 ccm ein und fällen die Produkte mit Alkohol aus, nämlich a mit $^1/_2$ l 85prozentigem, b mit $^1/_2$ l 90prozentigem Alkohol. Die Niederschläge fallen gut filtrierbar aus, die Mutterlaugen sind sehr hell. Die Komponente b wird vollkommen homogen erhalten, a hingegen mit einer durch die Spaltungsprobe gut nachweisbaren Beimischung von b, jedenfalls weniger als 5%.

Ausbeute: a 6,8 g, b 3,2—3,3 g; die Verluste durch alle Reinigungsoperationen betrugen also im ganzen nur etwa 15%.

Um das Phäophytin a auch ganz einheitlich zu gewinnen, wiederholen wir die Fraktionierung mit Salzsäure in folgender Weise.

10 g der oben beschriebenen Darstellung werden in 2,5 l Äther wieder aufgelöst. Wie bei der ersten Trennung ziehen wir achtmal mit je 2 l der äthergesättigten kalten 30prozentigen Salzsäure aus und halten das Äthervolumen bis zur sechsten Ausschüttelung konstant, während es am Ende abnehmen darf. Dabei bleiben gegen 10% der Substanz, ein Gemisch von b mit a, mit brauner Farbe im Äther zurück.

Jeder einzelne saure Phäophytinauszug kommt sofort in einen großen Scheidetrichter, durch den wir mit Vorsicht beständig einen Strom Wasser fließen lassen. Die verdünnte Säure fließt grünlich ab und nimmt etwas hydrolysiertes Phäophytin mit. Immerhin ist es zweckmäßig, die ätherische Lösung noch ein- bis zweimal mit je $^1/_2$ l 25prozentiger Salzsäure davon frei zu waschen, dann mit Wasser bis zur neutralen Reaktion. Am Ende wird der Äther auf 1 l abgedampft, filtriert und weiter auf 150 ccm eingeengt. Dann fällen wir das reine Phytylphäophorbid a mit $^1/_2$ l 85prozentigem Alkohol aus, unter kräftigem Umschütteln, um ein Zusammenbacken der voluminösen Ausscheidung zu verhüten.

Die Ausbeute beträgt 8,6 g.

2. Fraktionierung der Methylphäophorbide[1]).

Das Ausgangsmaterial ist das Gemisch der Methylchlorophyllide. Nachdem man es auf Grund verschiedener Verteilung zwischen Äther-Petroläther und Holzgeist in seine beiden Komponenten zerlegt hat, lassen sich aus ihnen die einheitlichen Methylphäophorbide sehr leicht und in quantitativer Ausbeute durch Einwirkung von Säure darstellen. Die ätherische Lösung des Methylphäophorbids a wird mit 10 prozentiger, die von b mit 15 prozentiger Salzsäure ein paar Minuten geschüttelt, etwas länger als für den vollständigen Farbumschlag nötig ist, damit die Präparate ganz aschefrei werden. Bei mäßigem Einengen der ätherischen Lösungen krystallisieren die schwer löslichen Phäophorbide prachtvoll aus.

Viel leichter ausführbar und exakter ist aber die Trennung der magnesiumfreien, daher säurebeständigen Derivate auf Grund ihrer etwas verschiedenen Basizität, also durch Anwendung der Methode von Willstätter und Mieg. Daher ist es rationeller, zuerst aus dem Gemisch der beiden Methylchlorophyllide mit Säure das Magnesium zu entfernen und dann die Fraktionierung des gebildeten Methylphäophorbidgemisches mit 17 prozentiger Salzsäure vorzunehmen. Diese Konzentration entspricht der Salzsäurezahl der Komponente a, während b von 16- bis 17 prozentiger Säure nur spurenweise und erst von 21 prozentiger reichlich aufgenommen wird.

2 g Methylchlorophyllidgemisch (etwa 2 Teile a, 1 Teil b enthaltend) lösen wir in wenig Pyridin und tragen es in 4 l Äther ein; wegen der Schwerlöslichkeit des entstehenden Methylphäophorbids b ist es nötig, in so verdünnter Lösung zu arbeiten. Bei kräftigem Durchschütteln der ätherischen Lösung mit 17 prozentiger Salzsäure erfolgt der Farbumschlag und die Zersetzung der komplexen Verbindung, während zugleich die Extraktion des Methylphäophorbides a beginnt. Die Säure färbt sich tiefblau an; sechsmaliges Ausschütteln mit je 1 l der Säure ist erforderlich, bis diese nur noch schwach blaue Farbe zeigt. Die Salzsäure wirkt

[1]) Ann. d. Chem. 387, 370 [1912].

auf die eine leicht verseifbare Estergruppe allmählich hydrolysierend ein; die saure Lösung bleibt deshalb nicht unnötig stehen, sondern man läßt sie aus dem Scheidetrichter in einen zweiten fließen, wo sie zur Entfernung einer Spur mitgerissenen Methylphäophorbids b und unter Verlust von ein wenig a mit Äther gewaschen wird. Diesen Waschäther von jedem einzelnen salzsauren Auszug geben wir in den ersten Scheidetrichter zurück und halten dadurch das Volumen der ätherischen Schicht konstant. Jeder salzsaure Auszug fließt sofort nach dem Waschen in einen dritten Scheidetrichter, wird hier mit dem gleichen Volumen Wasser und mit $n/_{100}$-KOH gewaschen, die bei schnellem Arbeiten nur ganz wenig freies Phäophorbid zu beseitigen hat. Dann trocknen wir die olivgrüne Ätherlösung und dampfen sie langsam ein, bis auf etwa 100 ccm; das Produkt ist so rein, daß man es nicht in Fraktionen zu isolieren braucht. Während des Abdampfens krystallisiert das Methylphäophorbid a in einzeln ausgebildeten Krystallen von prächtigem, violettschwarzem Glanz aus.

Für die Reinigung der Komponente b wird nach dem Ausziehen der Hauptmenge von a die ätherische Lösung noch zweimal mit etwas 18prozentiger Salzsäure und mit Wasser gewaschen und dann abgedampft; schon in der Wärme vom Beginn des Einengens an krystallisiert das reine Methylphäophorbid b in metallglänzenden dunkelgrauen Blättchen.

Die Ausbeute ist nur von der Zusammensetzung des angewandten Methylchlorophyllidgemisches abhängig; bei dem angegebenen Verhältnis beträgt sie 1 g Methylphäophorbid a und 0,5 g von b.

Die Äthylphäophorbide lassen sich mit dem Salzsäureverfahren ebenso wie die Methylverbindungen trennen; auch hier ist 17prozentige Säure geeignet.

3. Umesterung des Phäophytins mit Chlorwasserstoff und Alkohol[1]).

Für das Chlorophyll bietet allein die Anwendung der Chlorophyllase die Möglichkeit, Veränderungen an der Phytolestergruppe

[1]) Unveröffentlicht.

vorzunehmen und auf diese zu beschränken. Saure Medien sind wegen der Empfindlichkeit des Magnesiumkomplexes ausgeschlossen, alkalische wegen der Veränderlichkeit der Lactamgruppen und der Verseifbarkeit auch der zweiten Estergruppe. Hingegen gelingt es beim Phäophytin, das sich unter der Wirkung der Chlorophyllase nur träge umsetzt, lediglich die Phytolestergruppe mit Hilfe von Säure umzuwandeln, nämlich mit den einfachen Alkoholen bei Gegenwart von etwas Chlorwasserstoff nach der Methode von A. Haller [1]) umzuestern oder mit starker wässeriger Salzsäure zu verseifen. Hierauf beruhen wichtige präparative Methoden, wovon zunächst die Gewinnung des Methylphäophorbids beschrieben wird.

Phäophytin löst sich in Holzgeist auch in der Wärme nur schwer, viel leichter aber bei Gegenwart von nur wenig Chlorwasserstoff. Die Flüssigkeit fluoresciert sehr lebhaft dunkelrot und ist tiefblau, merkwürdig übereinstimmend bei den Phäophorbiden der a- und b-Reihe, die sich nur durch das mehr blaue Tingieren von a und mehr grünliche von b unterscheiden und durch die dunklere Nuance der Fluorescenz von a.

10 g Phäophytin werden möglichst fein zerdrückt, mit 1 l Methylalkohol angeschüttelt und unter Umrühren, damit die Substanz nicht zusammenklebt, mit 100 ccm 22 prozentiger methylalkoholischer Chlorwasserstoffsäure versetzt. Beim Kochen unter Rückfluß wird die Methanolyse in 1 Stunde vollständig. Dann wird eine Probe nach dem Überführen in Äther quantitativ von 22 prozentiger Salzsäure extrahiert, während sich diese mit ätherischer Phäophytinlösung gar nicht anfärbt (Basizitätsprobe).

Die Flüssigkeit wird etwas abgekühlt, in 4 l Äther eingegossen und der Methylalkohol mit Wasser herausgewaschen. Nun krystallisiert aus der Lösung, noch ehe sie eingeengt worden, ein Teil des Methylphäophorbidgemisches aus, worin die Komponente b sehr angereichert ist. Das Filtrat wird bis auf etwa 300 ccm eingedampft, wobei sich eine schöne Krystallisation der Methylverbindung abscheidet, überwiegend Komponente a. Endlich

[1]) Compt. rend. 143, 657 [1906]; 144, 462 [1907]; 146, 259 [1908]. — A. Haller und Youssoufian, Compt. rend. 143, 803 [1906].

erhalten wir bei stärkerem Konzentrieren eine kleinere dritte Fraktion, die beinahe nur aus a-Methylphäophorbid besteht. Diese einzelnen Krystallisationen eignen sich infolge der Anreicherung der Komponenten besonders zum Fraktionieren nach der oben beschriebenen Salzsäuremethode.

Die gesamte Ausbeute beträgt 6,2 g, d. i. 90% der Theorie.

Die ätherische Mutterlauge, die sich mit 22prozentiger Salzsäure entfärben ließ, enthält das abgespaltene Phytol, aber nicht in unveränderter Form. Das beim Eindampfen in einer Ausbeute von 3,1 g hinterbleibende Öl ist zum Unterschied vom Phytol in Holzgeist nur mäßig löslich und erweist sich bei der Metoxylbestimmung in der Hauptsache als Phytolmethyläther.

4. Bildung und Trennung der freien Phäophorbide[1]).

Freies Phäophorbid, ein Gemisch beider Komponenten, bildet sich beim Ansäuern von Chlorophyllid oder durch Hydrolyse von Methylchlorophyllid mit Salzsäure. In diesem Fall reicht die zur Fraktionierung des Gemisches geeignete 16prozentige Säure nicht zur Hydrolyse hin, aber es bedarf auch nicht so konzentrierter Salzsäure wie für die Hydrolyse der Phytylverbindungen.

Wir lösen 2 g Gemisch der beiden Methylchlorophyllide mit Hilfe von Pyridin in 4 l Äther und extrahieren dreimal mit je $^1/_2$ l 25prozentiger Salzsäure. Die saure Lösung bleibt bei Zimmertemperatur 2 Stunden stehen. Dann ist die Hydrolyse, deren Verlauf man durch Ausäthern von Proben und Versetzen mit $n/_{100}$-KOH verfolgt, so gut wie beendigt. Wir äthern die Substanz aus und fällen sie durch Einleiten von trockenem Ammoniakgas als braunes, flockiges Ammonsalz, das mit Talk gesammelt und abfiltriert wird; etwas übriggebliebener Ester befindet sich im Filtrat. Die Carbonsäure wird wieder frei gemacht, indem wir den Talk alsbald auf der Nutsche mit ein wenig Chlorwasserstoff

[1]) Ann. d. Chem. 387, 378 [1912].

enthaltendem Aceton extrahieren. Das Filtrat trägt man in Äther ein, wäscht das Aceton heraus und führt nun wie beim folgenden Verfahren die Fraktionierung des Gemisches durch. Die Ausbeute betrug 1,0 g Phäophorbid a und 0,55 g von b.

Gewinnung durch Hydrolyse von Phäophytin. Praktisch wichtiger ist die Hydrolyse des Phäophytins, durch welche die beiden freien Phäophorbide zu den leichtest zugänglichen und schönsten Ausgangsmaterialien für künftige Untersuchungen werden.

Das Phäophytin darf nur aus den zwei reinen Komponenten bestehen, also bei der Spaltungsprobe keine schwach basischen Verbindungen liefern, da sonst den beiden Komponenten ihre allomerisierten Derivate beigemischt bleiben.

Die ätherische Lösung des Phäophytins wird ohne Kühlung in konzentrierte (34—35prozentige) Salzsäure eingetragen, z. B. 4 g Phäophytin mit etwa 800 ccm Äther in 2 l Säure. Schon nach $^3/_4$—1 Stunde zeigt eine Probe, daß quantitativ Carbonsäure gebildet ist. Nun versetzen wir die Salzsäure mit 800 ccm Wasser und beseitigen das Phytol durch Ausäthern. Die saure Lösung wird sodann weiter verdünnt und der Farbstoff mit etwa 7 l Äther extrahiert; man darf dabei nicht zu wenig Äther anwenden, da sonst Phäophorbid ausfällt. Nach dem Einengen der ätherischen Lösung auf 5 l ziehen wir aus dem Gemisch der Carbonsäuren das Phäophorbid a fünfmal mit je 1 l 16prozentiger Salzsäure aus. Die einzelnen salzsauren Auszüge werden mit 200 ccm Äther gewaschen und der Waschäther jedesmal zur ätherischen Mutterlauge zurückgegeben. Diese haben wir, um die letzten Spuren von a zu beseitigen, noch zweimal mit $^1/_4$ l 17prozentiger Salzsäure ausgeschüttelt. Für präparative Zwecke lohnt es sich nicht, diesen Auszug zu verarbeiten. Nach der Reinigung durch die 17prozentige Säure bleibt einheitliches Phäophorbid b zurück, dessen Lösung nach dem Waschen mit Wasser und Trocknen eingedampft wird (Ausbeute 0,9 g). Die Komponente a braucht nur aus der salzsauren Lösung unter Verdünnen mit Wasser in Äther übergeführt zu werden und krystallisiert auch vollständig beim Konzentrieren (1,6 g).

5. Beschreibung der Phäophorbide.

Phytylphäophorbide [1]).

Die Komponente a $[C_{32}H_{32}ON_4]$ $(COOCH_3)$ $(COOC_{20}H_{39})$ + $^1/_2$ H_2O löst sich in absolutem Alkohol in der Kälte schwer, in der Hitze ziemlich leicht mit sepiabrauner Farbe; ein kleiner Gehalt an Wasser drückt die Löslichkeit stark herunter. Aus der alkoholischen Lösung scheidet sich die Substanz bei raschem Abkühlen grobflockig, bei langsamem mehr körnig aus und in Gebilden, die sich unter dem Mikroskop als baumartig verzweigte krystallinische Aggregate ohne scharfe Begrenzungen erweisen. Äther löst das Phäophytin a leicht, wenn auch langsam; in Benzol und Aceton ist es sehr leicht, in Chloroform und Pyridin spielend löslich, in Petroläther schwer löslich. Die starken Lösungen sind olivbraun, die verdünnteren olivgrün, ähnlich denjenigen des Phytochlorins e, aber zum Unterschied von diesem schwach rot fluorescierend.

In Eisessig löst es sich in der Kälte ziemlich schwer, warm mäßig mit violettstichig brauner Farbe, in Ameisensäure hingegen schon kalt sehr leicht mit indigblauer Farbe.

Getrocknet bildet die Phytylverbindung blauschwarze, zähe, etwas wachsartige Klumpen; im Schmelzpunktsröhrchen tritt bei 110—114° Zusammensintern ein, dann bis 120° Übergang in zähflüssigen Zustand.

Mit konzentrierter methylalkoholischer Kalilauge gibt das Phäophytin a die gelbe Phase, aber sie geht noch rascher vorüber als bei der Magnesiumverbindung. Auch bei dem Phäophytin tritt dann in der alkalischen Lösung chlorophyllgrüne Farbe auf, die durch die Bildung eines Komplexes erklärt wird, in welchem das Kalium dieselbe Funktion hat wie das Magnesium im Chlorophyll[2]). Diese Komplexbildung tritt nur bei großer Alkalikonzentration ein.

Die Salzsäurezahl der Komponente a ist 29, die saure Lösung ist rein blau. Beim Unterschichten einer gekühlten Ätherlösung mit konzentrierter Salpetersäure färbt sich der Äther schön violettblau; die Komponente b gibt bei dieser Reaktion nur kurz eine

[1]) Ann. d. Chem. 390, 332 [1912].
[2]) Siehe Kap. XVI, Abschn. 3.

grüne Farbe, die infolge tiefergreifender Einwirkung in Rotbraun umschlägt.

Das Phäophytin b $[C_{32}H_{30}O_2N_4](COOCH_3)(COOC_{20}H_{39})$ ist viel schwächer basisch; seine Salzsäurezahl ist 35, die sauren Lösungen sind grün.

Die Phase mit alkoholischer Lauge ist schön rot, aber von kurzer Dauer.

Die Phytylverbindung b bildet eine grünschwarze Masse, die spröder ist als a und leichter zu einem grauschwarzen Pulver zerkleinert werden kann; beim Erhitzen sintert die Substanz bei 148—152°, wird zähflüssig und bläht sich bei 160—170° auf.

In absolutem Alkohol ist das Phäophytin b in der Kälte schwer, in der Wärme ziemlich schwer, nämlich viel schwerer als a löslich mit grünlichgelb tingierender, rotbrauner Farbe und schwacher, bräunlichroter Fluorescenz. In Äther, worin es sich beträchtlich löst, zeigt es sehr ähnliche Farbe, welche an die der Phytorhodine erinnert. In 95prozentigem Sprit ist die Substanz selbst in der Hitze nur sehr schwer löslich, in Petroläther kalt äußerst schwer und auch beim Kochen nur sehr wenig. Das Phäophytin b wird daher besser als a aus Alkohol- oder Acetonlösung von Petroläther gefällt.

Aus der warmen alkoholischen Lösung scheidet es sich schön feinkörnig aus, weniger flockig als a; unter dem Mikroskop waren auch nur dendritische Aggregate oder rundliche Körner zu beobachten.

Methylphäophorbide [1]).

Die Komponente a $[C_{32}H_{32}ON_4](COOCH_3)_2$ krystallisiert in scharf begrenzten rhombenförmigen Blättchen, die oft mit bloßem Auge zu erkennen sind, und in Prismen, die schwalbenschwanzförmige Zwillingsbildungen zeigen (Tafel IV, Fig. 1). Sie besitzen prachtvollen violettschwarzen Glanz und bilden zerrieben ein dunkelviolettes Pulver. Unter dem Mikroskop erscheinen die dünnsten Krystalle bräunlichgrau, dickere bräunlichgelb bis braunrot.

---

[1]) Ann. d. Chem. 387, 373 [1912].

In Äther löst sich der Methylester sehr schwer mit olivbrauner, in dünner Schicht olivgrüner Farbe und dunkelroter Fluorescenz. In Petroläther ist die Substanz unlöslich, in den Alkoholen in der Kälte fast unlöslich, beim Kochen beträchtlich löslich, in Chloroform spielend, noch leichter als in Pyridin.

Die Salzsäurezahl von Methylphäophorbid a ist 16, von b 21.

Das Methylphäophorbid b $[C_{32}H_{30}O_2N_4](COOCH_3)_2$ ist in Krystallform und Löslichkeit dem entsprechenden a-Derivat sehr ähnlich. Die grauschwarzen Krystallisationen aus Äther bestehen immer aus großen, einzeln ausgebildeten und scharf begrenzten Rhomben (Tafel IV, Fig. 2), während die Blättchen des Methylphäophorbids a oft gerundete Formen zeigen und sich zu Drusen gruppieren. In der Durchsicht unter dem Mikroskop sind die Krystalle des Methylphäophorbids b mit zunehmender Dicke olivgrün, hellbraun und braun, während sich die Farbe bei a eher zu Rot vertieft. In den Lösungen erscheint das Verhältnis in den Farben entgegengesetzt: Methylphäophorbid a ist in Äther olivbraun, b hingegen zeigt rotbraune Farbe mit grünlichgelbem Tingieren.

Die Komponente b ist in Äther äußerst schwer und auch in den siedenden Alkoholen nur sehr wenig löslich.

Freie Phäophorbide [1]).

Die Komponente a $[C_{32}H_{32}ON_4](COOCH_3)(COOH)$ krystallisiert aus Äther und aus Alkohol prächtig in blauschwarz glänzenden, scharf begrenzten rhombenförmigen Täfelchen, deren spitze Winkel oft gerade abgestumpft sind. Auch das Pulver ist blauschwarz, nicht dunkelviolett wie das des Methylesters. Unter dem Mikroskop sind dünne Krystalle olivgrün, dickere olivbraun bis braun. In absolutem Alkohol ist die Substanz in der Kälte schwer, in der Wärme leicht löslich, in Äther ziemlich schwer, leicht in Aceton, spielend in Pyridin und Chloroform, dagegen ist sie in Petroläther unlöslich. In den üblichen Solvenzien hat die Carbonsäure dieselbe olivgrüne bis olivbraune Farbe wie ihr Methylester und auch die deutliche dunkelrote Fluorescenz.

---

[1]) Ann. d. Chem. 387, 381 [1912].

In Ameisensäure ist das Phäophorbid äußerst leicht mit prächtig blauer, in der Durchsicht violettroter und roter Farbe löslich, dieselbe Farbe wird z. B. in der Acetonlösung durch einen kleinen Zusatz von Salzsäure hervorgerufen; bei der Komponente b ist für den entsprechenden Farbwechsel mehr Säure erforderlich. Eisessig löst die Substanz nur violettstichig braun, während sich darin die Phytochlorine, weil sie stärker basisch sind, schon mit blauer Salzfarbe lösen.

Die ätherische Lösung (0,02 g in 100 ccm) reagiert quantitativ mit $n/_{100}$-Ammoniak und -Kalilauge, welche das Phäophorbid mit brauner Farbe extrahieren; stärkere ($n/_4$) Kalilauge fällt zuerst flockiges Kaliumsalz und löst es dann allmählich, sehr verdünnte ($n/_{1000}$) färbt sich nur wenig olivgrün an. Auch 0,1 prozentige Sodalösung und 1 prozentiges Natriumbicarbonat sowie Dinatriumphosphat fällen das Phäophorbid quantitativ als Salz aus; dagegen nimmt 0,25 prozentiges Dinatriumphosphat nur eine Spur von der Substanz auf und gibt keine Fällung.

Bei den Phäophorbiden a und b bleiben zum Unterschied von den Chlorophylliden beim Überführen in verdünnte Alkalien und bei längerem Stehen in alkalischer Lösung die Lactamgruppen unverändert; denn starke Alkalilauge bewirkt noch die braune Phase, auch liefern die wieder in Freiheit gesetzten Phäophorbide noch normales Chlorin und Rhodin.

Die Salzsäurezahl des Phäophorbids a ist 15, die von b 19—20.

Die Komponente b $[C_{32}H_{30}O_3N_4](COOCH_3)(COOH)$ ist stärker sauer als a, etwa in demselben Maße, wie sich die zwei Chlorophyllide unterscheiden. Phäophorbid b wird z. B. schon durch 0,2 prozentige Natriumbicarbonatlösung quantitativ aus ätherischer Lösung (0,02 g in 100 ccm) extrahiert, während diese gar nicht auf die Ätherlösung der Carbonsäure a einwirkt. Auf Grund dieser Differenz kann man die Phäophorbide voneinander trennen. Phäophorbid b geht auch zum Unterschied von a in $^1/_4$ prozentige Lösung von Dinatriumphosphat quantitativ über und färbt schon 0,005 prozentige Sodalösung ziemlich stark an. Auffallend ist der Unterschied in der Farbe zwischen den Lösungen in verdünnten

und sehr verdünnten Alkalien. Die Substanz geht in $n/_{100}$-Ammoniak und Kaliumhydroxyd mit braunroter, in $n/_{1000}$-Lösung mit rein brauner und in $n/_{2000}$-Alkalien mit olivgrüner Farbe; diese nehmen bei einmaligem Durchschütteln etwa die Hälfte des Phäophorbids aus dem Äther. $n/_{4000}$-Ammoniak extrahiert ein Viertel mit gelbgrüner Farbe.

Das Phäophorbid gibt mit methylalkoholischem Kali eine rein rote Phase, die viel rascher vorübergeht als bei den Estern.

Phäophorbid b krystallisiert aus Äther beim Abdampfen in sehr kleinen rhombenförmigen Täfelchen, beim Erkalten der alkoholischen Lösung in grauschwarz glänzenden Rhomben.

Es ist in Äther zwar ziemlich schwer, aber viel leichter löslich als die Methylverbindung; die Lösung ist rotbraun und tingiert grünlich gelb. In Äthylalkohol ist es in der Wärme ziemlich leicht, kalt schwer löslich, leicht in Aceton, spielend in Chloroform und Pyridin.

Die Absorptionsspektra [1]).

Die drei Phäophorbide jeder der beiden Reihen sind einander in den Absorptionsspektren äußerst ähnlich. In den photographischen Aufnahmen der Tafel IX werden die Spektra der zwei Phäophytinkomponenten, die der Methylphäophorbide in der Zeichnung der Tafel VII wiedergegeben. Die Messungen sollen für einige Konzentrationen der Methylphäophorbide a und b angeführt werden, welche schärfere Begrenzungen der Bänder und der Endabsorption zeigen als die Phytylverbindungen.

Komponente a.

Zwischen den Fraunhoferschen Linien B und G besteht das Spektrum aus sieben scharf getrennten Bändern. Die Absorption im Rot ist gegenüber der Chlorophyllkomponente a fast unverändert, aber außerordentlich verstärkt die Absorption im Grün, nämlich die links und rechts von E nebeneinanderliegenden Bänder IV und V des Chlorophylls (beim Phäophytin V und VI) haben sehr an Intensität gewonnen.

---

[1]) Abh. XVII.

Die photographische Aufnahme läßt kaum deutlich erkennen, daß das Band im Rot von einem getrennten schmalen Streifen im Rotorange begleitet wird.

Lösung von 0,30 g in 1 l Äther ($^1/_{1000}$ Mol. in 20 l).

Schicht in mm	2,5	10	40	80
Band I	672...661	678—654	685—646	687—641
„ II	—	—	637 | 632	..631
„ III	—	614.602	619— —599	621—597
„ IV	—	—	565.552	566...552
„ V	536.530	536...530	539—528	541—526
„ VI	509.494	509...493	512—490	| 517—488
„ VII	—	—	478.464	480...461
Endabs. (VIII)	431.425—	433—	445.439—	.452—

Reihenfolge nach der Intensität: VIII, I, VI, V, III, VII, IV, II.

Komponente b. Das Spektrum setzt sich aus acht zumeist scharfen Bändern zusammen, aus je einem Band im Rot und Orange, vier Streifen im Grün und den beiden im Blau, wozu noch die kräftige Endabsorption (IX) hinzukommt. Immerhin ist das Phäophytinspektrum weniger gegliedert als das des Chlorophylls, indem es statt der gegabelten Absorptionen im Rot und Orange die einfachen Bänder aufweist. Die Absorption im Grün ist in dem Doppelband IV und V verstärkt, wenn auch nicht ganz in dem Maße wie bei den analogen Derivaten von a.

Die Absorptionsspektra der Komponenten a und b zwischen den Fraunhoferschen Linien B und F sind gleichartig und einander sehr ähnlich trotz der auffallenden Farbverschiedenheit der beiden Lösungen. Das Band im Rot und das im Orange ist bei b gegen Violett hin verschoben, erheblich gegen Rot hin verschoben ist das äußere Band im Grün, so daß es nahe an das erste Band im Grün (IV) gerückt ist und in die Lücke der gegabelten Absorption von a fällt. Der schmale Streifen II in a fehlt der Verbindung b. Unterscheidend gegenüber a ist ferner eine zweiarmige, sehr starke Absorption im Indigblau (Band VII und VIII).

Die aus dem Gesamtchlorophyll entstehenden Gemische der Phäophytinkomponenten (z. B. das von Willstätter und Hoch-

eder[1]) beschriebene Präparat) zeigen daher alle Absorptionsstreifen verbreitert und verschwommen im Vergleich mit der scharfen Begrenzung und charakteristischen Gliederung der Spektra beider Komponenten.

Lösung von 0,030 g in 1 l Äther ($^1/_{1000}$ Mol. in 20 l).

Schicht in mm	2,5	10	40	80
Band I	659...652	664—646	670—640	674—636
„ II	603 | 595	605..593	608— —591	612—589
„ III	—	563.552	565.551	566—550.
„ IV	537 | 531	538..530	539—529..	541—508
„ V	523 | 517	524..516	525—513	
„ VI	—	—	494.483	494..481
„ VII	453...442			
„ VIII	—427.	457—	463—	465—
Endabs. (IX)	415—			

Reihenfolge der Intensitäten: IX, VIII, VII = I, IV, V, II, III, VI.

[1]) Ann. d. Chem. 354, 227 [1907].

XVI. Phytochlorine und Phytorhodine[1]).

1. Darstellung von Phytochlorin e und Phytorhodin g aus den Phäophorbiden.

Phytochlorin e und Phytorhodin g sind die wichtigsten Produkte der Hydrolyse von Phäophytin und anderen Phäophorbiden.

Da diese Spaltungsprodukte nicht einfach durch Verseifung der zwei Estergruppen, sondern zugleich durch eine von mehreren möglichen Umänderungen der Lactamgruppen entstehen, so ist die Reaktion gleich der Verseifung des Chlorophylls in hohem Maße von den Bedingungen abhängig[2]). Je nach dem Hauptzweck, welchem die Hydrolyse dient, der Gewinnung des Phytols oder der Isolierung der basischen Spaltungsprodukte, kommen verschiedene Verfahren für die Verseifung des Phäophytins in Betracht, die mit alkoholischer Kalilauge kalt und heiß ausgeführt werden kann, aber nie mit Verdünnungsmitteln, also nicht unter Anwendung ätherischer Phäophytinlösungen. In diesem Fall würde statt des beständigen Phytochlorins e das schwächer basische, unbeständige Chlorin g und anstatt des Phytorhodins g das schwach basische Phytorhodin k auftreten.

Von den folgenden drei Verfahren eignen sich die beiden ersten für die Gewinnung von Phytol in großem Maßstab.

Erstes Verfahren (nach Willstätter und Hocheder). Verseifung durch längeres Erhitzen mit alkoholischer Kalilauge.

Phäophytin wird im Wasserbad am Rückflußkühler mit methylalkoholischem Kali gekocht, und zwar werden für das Gramm Phäophytin 5—$7^1/_2$, meistens 6 ccm, von der Lauge angewandt.

[1]) Abh. III und XVI.
[2]) Siehe Kap. IV, Abschn. 2.

Diese bereiten wir durch Auflösen von 200 g gewöhnlichem Stangenkali in 1 l Holzgeist. In einer Portion lassen sich einige Hundert Gramm hydrolysieren und ungeteilt auf Phytol verarbeiten.

Die Dauer des Erhitzens ist nur von der Art der Verteilung des Phäophytins abhängig. Bei feiner Zerkleinerung war $^1/_2$ Stunde hinreichend, beim Verarbeiten von Klumpen sind 4—6 Stunden erforderlich. Ob die Verseifung beendigt ist, erkennt man daran, daß keine Klümpchen von unverseiftem Phäophytin mehr vorhanden sind und zweitens, daß eine herausgenommene Probe beim Schütteln mit 20prozentiger Salzsäure und Äther in diesen keine Chlorophyllsubstanz mehr gehen läßt.

Für die Ausbeute und Reinheit des Phytols bietet das lange Erhitzen keinen Nachteil, hingegen für die basischen Verbindungen, da namentlich Phytorhodin g Erhitzen mit alkoholischer Kalilauge nicht verträgt und je länger, je mehr in amorphe unlösliche Flocken verwandelt wird[1]).

Willstätter und Hocheder brachten deshalb, um das nicht pulverisierbare Phäophytin für die Verseifung leicht angreifbar zu machen, es dadurch in feine Verteilung, daß sie die Substanz mit viel Seesand und Äther (4 l für 33 g) bis zur vollständigen Auflösung schüttelten und die Flüssigkeit mitsamt dem Sand im Rundkolben zur Trockne abdampften; der Rückstand ist im gleichen Gefäß verkocht worden.

Statt dessen ist es auch sehr zweckmäßig, das Phäophytin nach und nach in kleinen Anteilen in die zum Sieden erhitzte Kalilauge einzutragen. Das Zusammenklumpen des wachsartigen Produktes wird dadurch verhütet und die Verseifung beschleunigt.

Zur Extraktion des Phytols kann man zur dunkelgrünen Lauge, die eine starke Ausscheidung von rotbraunem Kalisalz enthält, mehr als das gleiche Volumen Äther und so viel Wasser hinzufügen, daß sich eben die Ätherschicht klar abtrennt. Sie wird abgehoben und die Lauge noch mehrmals mit viel Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten bräunlichen Ätherlösungen enthalten das Phytol. Oder man schüttelt ohne Zusatz von Wasser im Kolben selbst die

[1]) Ann. d. Chem. 380, 162 [1911] und 382, 189 [1911].

alkalische Flüssigkeit mit sehr viel Äther kräftig an, und zwar mit so viel, daß mit den Salzen der Spaltungsprodukte auch das Ätzkali pulvrig ausfällt und der Methylalkohol vom Äther weggelöst wird. Dann kann man leicht dekantieren und unter kräftigem Anschütteln und Anrühren den zähen Salzbrei noch ein paarmal mit Äther ausziehen.

Zweites Verfahren (nach Willstätter und Utzinger). Verseifung in der Kälte durch Schütteln mit alkoholischer Lauge.

Schonend für das Phytorhodin und in großem Maßstab leicht ausführbar ist die kalte Verseifung unter Schütteln an der Maschine.

Wir verwenden von einer konzentrierteren, ungefähr 40prozentigen Lauge, die wir aus 1 l Methylalkohol mit 600 g Stangenkali herstellen, für das Gramm Phäophytin bei kleinen Portionen 10, bei großen 6 ccm und schütteln in dickwandigen Flaschen zusammen mit Quarzstücken oder -kugeln zwei bis drei Tage, bis die Basizitätsprobe das Ende der Verseifung erkennen läßt.

Für diesen Zweck eignet sich auch ein Apparat von Leune in Paris, der Broyeur Borrel; er läßt eine auf seine horizontale Achse montierte flache Flasche rotieren, wobei ihr Inhalt emulsioniert und mit Glaskugeln bearbeitet wird.

In derselben Weise, aber noch leichter, erfolgt die Verseifung der einfachen Alphylphäophorbide, da sich diese Substanzen fein pulverisieren lassen. Für die Hydrolyse genügt hier etwa zweistündiges Schütteln mit der zehnfachen Menge an alkoholischem Kali unter Zusatz von 10% Wasser.

Drittes Verfahren [1]). Rasche Verseifung in der Hitze unter Anwendung von Pyridin und sehr viel Kalilauge.

Wenn es sich nicht um Verarbeitung großer Mengen, sondern um Bildung und Trennung von Chlorin e und Rhodin g mit der besten Annäherung an die quantitative Bestimmung handelt, dann verdient folgende Arbeitsweise den Vorzug, nach welcher diese basischen Spaltungsprodukte mit der geringsten Beimischung der schwach basischen Derivate erhalten werden.

---

[1]) Unveröffentlicht.

Wir lösen 6 g Phäophytin in 20 ccm Pyridin von 80° und tragen die warme Lösung in dünnem Strahl unter Umrühren mit einem Silberstab in die Lauge ein, die aus 250 ccm Holzgeist mit 160 g alkoholgereinigtem Ätzkali hergestellt worden. Sie befindet sich in einem hohen Silberbecher und wird in nur schwachem Sieden gehalten.

Schon nach $^1/_2$ Minute darf man unterbrechen und mit kaltem Wasser den Becher abkühlen. Die Verseifung ist beendigt, die Prüfung der Spaltungsprodukte ergibt nur Spuren von Schwachbasischem.

Fraktionierung der Spaltungsprodukte. Erstes Beispiel [1]).

Es behandelt die Aufarbeitung der zuletzt beschriebenen Verseifung von 6 g. Um ihre Produkte ganz einheitlich zu isolieren und Verluste dabei zu vermeiden, übertragen wir das Verfahren der Komponentenbestimmung auf den größeren Maßstab.

Die alkalische Lösung wird mit Wasser in einen 7-l-Scheidetrichter gespült und mit 3 l Äther überschichtet. Durch allmählichen Zusatz von 20prozentiger Salzsäure und unter kräftigem Durchschütteln führen wir die Hauptmenge der basischen Verbindungen in Äther über. Ein Teil des Rhodins kann sich dabei in Flocken ausscheiden. Dann läßt man sie mit der wässerigen Schicht ab, macht mit Ammoniak wieder alkalisch und bringt durch erneutes Ansäuern in einem anderen Scheidetrichter den Rest in weitere 2 l Äther.

Die gesamte ätherische Lösung ziehen wir achtmal aus mit je 1 l 3prozentiger Salzsäure; die grünblaue Chlorinlösung wird mit Äther gewaschen, je zwei Auszüge mit 200 ccm, um Spuren von Rhodin zu beseitigen. Dann neutralisiert man mit Ammoniak, bis ihre Farbe in Violettblau umschlägt. An diesem Punkt geht die Substanz leicht in Äther und wird in zwei Malen, nämlich mit 3 und 1 l Äther, quantitativ extrahiert. Den Äther wäscht man vorsichtig nur mit wenig Wasser. Solange dieses nur eine Spur Säure aufnimmt, bleibt es frei von Chlorin, bei wiederholtem

[1]) Unveröffentlicht; die ältere Arbeitsweise siehe Ann. d. Chem. 354, 232 [1907].

Waschen mit größeren Mengen von Wasser geht aber das Phytochlorin reichlich mit Olivfarbe in das reine Wasser über und kann durch Äther daraus nur bei Zufügen von etwas Säure wieder extrahiert werden; dieses Verhalten kann man bei ätherischen Lösungen aus schon isoliertem Phytochlorin nicht wahrnehmen.

Die ätherische Rhodinlösung enthält noch eine geringe Beimischung von Chlorin und wird durch zwei Auszüge mit je 1 l 5 prozentiger Salzsäure davon befreit. Aus der sauren Flüssigkeit bringen wir die Substanz in Äther (1 l) und extrahieren diesen aufs neue mit 1 l 3 prozentiger Säure. Der sauere Anteil wird noch zum Chlorin, die Ätherschicht nach Waschen mit 5 prozentiger Salzsäure zum Rhodin geschlagen.

Das Phytorhodin g läßt sich in sechs bis acht Malen mit je 1 l 9 prozentiger Salzsäure extrahieren; alle Auszüge werden nacheinander oder paarweise mit den nämlichen 500 ccm Äther gewaschen. Die ätherische Mutterlauge, eine sehr verdünnte Rhodinlösung mit einem kleinen Gehalt von schwach basischem Chlorin, läßt sich am Ende mit drei Auszügen von je $^1/_2$ l 12 prozentiger Salzsäure erschöpfen. Diese werden auf 7% Chlorwasserstoffgehalt verdünnt, mit Äther vorsichtig gewaschen und mit der Hauptlösung vereinigt. Die Rhodinlösung neutralisieren wir in Dritteln bis zu trübgrüner Farbe und schütteln sie im ganzen mit 6—8 l Äther aus. Ohne abzuheben, neutralisiert man jeden Anteil noch weiter mit Ammoniak und schüttelt wieder kräftig durch.

Endlich werden die Chlorin- und Rhodinlösungen mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft, erstere auf etwa $1^1/_2$, die andere auf $2^1/_2$ l. Dann filtrieren wir von den ersten Ausscheidungen ab und dampfen noch weiter ein, mit der Vorsicht, daß das Wasser des Bades nicht höher stehe als das Ätherniveau im Kolben, da sich sonst Krusten fest an der Kolbenwandung ansetzen.

Die Ausbeute an den schönen Krystallisationen beträgt 1,05 g Phytorhodin g, d. i. fast die ganze mögliche Menge und 2,2 g Phytochlorin e, d. i. 82% der Theorie.

Zweites Beispiel.

Das erste, bei aller Umständlichkeit noch abgekürzt beschriebene Beispiel stellt ein analytisches Verfahren dar.

Bei präparativem Arbeiten wird man gewöhnlich nicht ganz denselben Reinheitsgrad der Spaltungsprodukte erzielen und wohl immer verschwenderischer fraktionieren. Die Summe der beiden Produkte geht dann selten über 40% vom Phäophytin.

Zur Abkürzung der beschriebenen Fraktionierung ist man genötigt, um Phytochlorin in der reinen Lactamhydratform zu erhalten, die sich bei längerem Verweilen in salzsaurer Lösung anhydridisiert, die aber für die Aufbewahrung den Vorteil der größeren Haltbarkeit bietet.

Nach der Entfernung des Phytols wird die alkalische Masse, z. B. aus 20 g Phäophytin, stark verdünnt und die Chlorophyllderivate werden unter Ansäuern in 12 l Äther übergeführt. Das Phytochlorin extrahiert man durch dreimaliges Ausschütteln mit im ganzen 4 l 4prozentiger Salzsäure genügend und wäscht die sauren Auszüge mit je 1—1½ l Äther, um mitgegangenes Rhodin vollständig zu entfernen. Aus der gereinigten sauren Lösung isolieren wir das Phytochlorin durch annäherndes Neutralisieren und Ausäthern und gewinnen es durch Einengen auf ½ l in der violetten Krystallisation des Hydrates; Ausbeute 5,2 g.

Nach der Abtrennung der Hauptmenge von Chlorin braucht man nur noch seine letzten Anteile durch mehrmaliges Ausschütteln mit 6prozentiger Salzsäure wegzunehmen, um die Rhodinlösung genügend rein zur Krystallisation übrig zu behalten. Nach dem Konzentrieren der verdünnten Ätherlösung scheidet es sich in schwarz glänzenden Prismen aus und hinterläßt eine braun gefärbte Mutterlauge; die Ausbeute betrug 2,8 g.

Schon eine langsame Ausführung der beschriebenen Isolierung von Phytochlorin e, längeres Stehen der salzsauren Lösung, wiederholtes Überführen in Salzsäure pflegt zur Folge zu haben, daß außer den violetten Krystallen die charakteristischen Blättchen der Anhydroform auftreten. Bei einer solchen Aufarbeitung der Spaltungsprodukte aus 7 g Äthylphäophorbid lieferte die Phytochlorinlösung beim Einengen auf 700 ccm zuerst eine voluminöse Abscheidung von 1 g glänzender schwarzer Blättchen der wasserfreien Modifikation, dann erst bei stärkerem Eindampfen die derben violett glänzenden Krystalle des Hydrates (1,8 g).

2. Bildung aus den Chlorophylliden.

Durch die Verseifung von Chlorophyll und den anderen Chlorophylliden in der Hitze entstehen Iso-Chlorophyllinsalz a und b. Diese sind nichts anderes als die Magnesiumderivate von Phytochlorin e und Phytorhodin g und sie liefern daher einfach beim Ansäuern ohne Nebenprodukt dieselben Verbindungen, die andererseits durch Einwirkung von Säure auf Chlorophyllide und danach von Alkalien auf Phäophorbide erhalten worden sind:

Iso-Chlorophyllin a ← Chlorophyll a Chlorophyll b → Iso-Chlorophyllin b
↓ ↓ ↓ ↓
Phytochlorin e ← Phäophytin a Phäophytin b ——→ Phytorhodin g

Dieser Weg zum Chlorin und Rhodin hat erst spät zum Ziel geführt, da mit verdünnten Chlorophyllösungen, mit den Extrakten, die Verseifung zu den Iso-Chlorophyllinsalzen nicht leicht ausführbar ist und gerade die Verseifung unter gelinden Bedingungen über die Chlorophyllinreihe die schwach basischen Verbindungen (Chlorin g, Rhodin k und i) ergibt.

Zum erstenmal haben Willstätter und Utzinger[1]) durch Einwirkung von viel heißem Bariumhydroxyd auf eine Rohchlorophyllösung und Ansäuern des gebildeten Bariumsalzes Phytochlorin e und Phytorhodin g erhalten und durch die Analyse identifiziert.

Auf der quantitativen Bildung beider beruht unsere Spaltungsprobe, die auch zur Bestimmung des Komponentenverhältnisses in Chlorophyllpräparaten Anwendung findet.

Die einheitlichen Chlorophyllkomponenten führen mühelos, nämlich ohne Fraktionierung, bei diesem Abbau zum Chlorin e oder Rhodin g.

Die Verarbeitung des gemischten Chlorophylls[2]) erfordert hingegen dieselbe Trennung wie die beschriebene Gewinnung aus Phäophytin: Nur vereinfacht sie sich dadurch, daß die Bildung der schwächeren Basen gänzlich vermieden werden kann.

4 g Methylchlorophyllid oder 6 g Chlorophyll tragen wir gepulvert in einigen Portionen in 100 ccm 35 prozentige reine methyl-

[1]) Ann. d. Chem. 382, 162 [1911].
[2]) Unveröffentlicht.

alkoholische Kalilauge ein, die im hohen Silberbecher zum Sieden erhitzt ist und gerührt wird. Unter diesen Bedingungen genügt wenige Minuten langes Kochen, so daß keine Estersäuren auftreten. Nach dem Erkalten wird die Flüssigkeit mit Wasser in den Scheidetrichter gespült und nach dem Überschichten mit 4 l Äther angesäuert. Aus der Ätherschicht ziehen wir das Chlorin wie oben mit 3prozentiger Salzsäure aus und behalten nach dem Waschen der ätherischen Lösung mit 5prozentiger Säure reines Phytorhodin in ihr zurück.

Dabei bleiben die Ausbeuten nicht weit hinter den theoretischen zurück.

3. Beschreibung.

Phytochlorin e.

Es tritt in zwei Modifikationen auf, als Lactamhydrat von der Formel $C_{34}H_{36}O_6N_4$, d. i. $[C_{31}H_{33}N_4](C(OH)_2)(COOH)_2$, derbe, undurchsichtige Krystallblätter mit mattem, violettem Glanz und als Lactam von der Formel $C_{34}H_{34}O_5N_4$ d. i. $[C_{31}H_{33}N_4](CO)(COOH)_2$, schwarzglänzende, ungefähr rechteckige Täfelchen (Tafel IV, Fig. 3).

Es erscheint naheliegend, die wasserhaltige Form als Tricarbonsäure zu erklären. Aber das Auftreten und Verschwinden der gelben Phase bei der Bildung von Phytochlorin läßt sich am besten als Folge der Öffnung und Wiederschließung einer Lactamgruppe verstehen, die wir deshalb in beiden Modifikationen annehmen. Diese zeigen auch in der Salzsäurezahl 3 und in anderen Merkmalen weitgehende Übereinstimmung.

Beide Formen geben braunschwarzes Pulver; die Krystalle sind in der Durchsicht hellgrün, olivgrün und braun.

Die reine Hydratform ist eine beständige Substanz, die heiß getrockneten Präparate blieben wie die nicht getrockneten beim Aufbewahren unverändert.

Die wasserfreie Modifikation läßt sich nur in dem Zustand unversehrt halten, wie man die Krystalle aus Äther isoliert. Getrocknet verwandelt sie sich teils in amorphes Unlösliches, teils in schwächer basisches Chlorin, endlich auch in ein Rhodin, das

ein charakteristisches, mit grüner Farbe in Äther lösliches Ammonsalz bildet.

Auch die Löslichkeit ist ungleich. Das Hydrat ist vor allem in Alkohol in der Kälte sehr schwer und heiß nur wenig leichter, in Aceton sehr schwer löslich, in Chloroform fast unlöslich. In siedendem Eisessig löst es sich ziemlich schwer, in kaltem schwer, in Ameisensäure leicht, in beiden mit tiefblauer Farbe, in Pyridin leicht mit Olivfarbe. Die Anhydroform ist in der Kälte in Eisessig ziemlich leicht, in Aceton ziemlich schwer, in Pyridin sehr leicht löslich. In kaltem Alkohol und in Chloroform löst sie sich ziemlich leicht; wenn man die gesättigte alkoholische Lösung kurz erwärmt, so fällt eine Krystallisation von kleinen, unscharf rechteckigen Täfelchen aus, die in der Durchsicht rotbraun erscheinen.

In Äther ist das krystallisierte Phytochlorin äußerst schwer löslich, die mit Hilfe von Säure oder Ammoniak gebildeten Ätherlösungen sind olivstichig grün.

Die Lösung in konzentrierter Schwefelsäure ist blaugrün, in konzentrierter Salzsäure smaragdgrün, beinahe wie Phytorhodin g sich in verdünnter Salzsäure löst, aber grün tingierend; beim Verdünnen wird die Lösung immer mehr blau, bei 2% Chlorwasserstoffgehalt ist sie rein-blau. Die verdünnt salzsaure Lösung wird durch Zusatz von ein wenig Alkohol mehr violett.

In konzentrierter Schwefelsäure verwandelt sich das Chlorin in eine ätherunlösliche amorphe Substanz, in Salzsäure erleidet es keine tiefgehende Änderung, aber beim Stehen in der Säure verliert die Hydratmodifikation Wasser. Wir haben sie zur Umwandlung in Lactam in 20prozentiger Salzsäure gelöst, auf 4% Chlorwasserstoffgehalt verdünnt und eine Woche lang stehen gelassen; die wieder isolierte Substanz krystallisierte aus Äther anscheinend einheitlich in den typischen schwarz glänzenden Formen des Lactams, doch ist die Abspaltung von Wasser nach der Analyse noch nicht vollständig.

Das Phytochlorin zeigt in beiden Modifikationen stark saure Eigenschaften, es geht aus dem Äther schon in 0,001prozentiges Ammoniak, vollständig in 0,01prozentiges über, in Dinatriumphosphat von 0,01% spurenweise, von 0,02% ziemlich leicht. Die

Lösungen in diesen verdünntesten Alkalien zeigen charakteristische violette Farbe, während die Substanz mit olivgrüner Farbe in Ammoniak oder andere Alkalien von etwas größeren Konzentrationen geht.

Ein charakteristisches Derivat des Phytochlorins ist sein Trimethylester $[C_{34}H_{33}O_5N_4](OCH_3)_3$, der beim Verreiben des Kaliumsalzes mit Methylsulfat entsteht. Er ist in Alkohol und Äther ziemlich leicht löslich und krystallisiert in stahlblauen, verfilzten Prismen vom Schmelzpunkt 188—190°; seine Salzsäurezahl ist 7, mit alkoholischer Kalilauge bildet er Phytochlorin zurück.

Phytorhodin g.

$C_{34}H_{34}O_7N_4$ d. i. $[C_{30}H_{31}N_4](CO)(COOH)_3$ oder
$[C_{30}H_{30}N_4](CO)(C[OH]_2)(COOH)_2$.

Es krystallisiert aus Äther in großen, derben, sechsseitigen Prismen mit schiefer Endigung (Tafel IV, Fig. 4); sie zeigen dunkelrote fast schwarze Farbe von metallischem Glanz. Die Lösungen in Äther, Alkohol und Eisessig sind blaustichig tiefrot und besitzen sehr schwache dunkelrote Fluorescenz.

Im krystallisierten Zustand ist die Substanz in Äther und Chloroform unlöslich, in Alkohol und Eisessig ziemlich leicht löslich. In Pyridin löst sich Rhoding sehr leicht, in Ameisensäure leicht mit smaragdgrüner Farbe, wie in konzentrierter Salzsäure. Obwohl die Salzsäurezahl 9 ist, erfordert die feste Substanz 17—20 prozentige Salzsäure zum Lösen, wenn sie ohne Äther angewandt wird.

Phytorhodin g ist eine stark saure Verbindung, es geht aus ätherischer Lösung leicht schon in 0,001 prozentiges Ammoniak und vollständig in 0,02 prozentiges Dinatriumphosphat mit rotstichig grünlicher Farbe.

Die Salze des Phytorhodins mit Kalium- oder Cäsiumhydroxyd sind tertiär. Sie werden von Methylsulfat in den Trimethylester verwandelt, der in schwarz glänzenden, rechteckigen und trapezförmigen Täfelchen vom Schmelzpunkt 207—210° krystallisiert. Seine Salzsäurezahl ist 13.

Die Absorptionsspektra (Tafel X, Kap. XXV)[1]).

Die vergleichende Untersuchung der Absorptionsspektra gibt einen überraschenden Ausdruck für die Beziehungen zwischen den zwei Chlorophyllkomponenten und ihren magnesiumfreien Derivaten zu ihren Spaltungsprodukten Phytochlorin e und Phytorhodin g.

Phytochlorin e in Äther zeigt ein aus fünf scharf begrenzten Bändern zusammengesetztes Spektrum, das dem der Phäophytinkomponente a äußerst ähnlich ist. Nur fehlen hier die schwachen Bänder II und VII des Phäophorbidspektrums, oder genauer, sie sind nur als schwache Schatten wahrzunehmen. Die übrigen fünf Bänder zeigen nicht allein dieselbe Reihenfolge hinsichtlich der Intensität: I, V, IV, II, III, sie stimmen auch in ihrer Stärke und Breite und fast genau im Ort überein mit den entsprechenden Bändern von Phäophorbid. Die Übereinstimmung ist auffallend, weil das Phytochlorin e ja nicht die den Estern Phäophytin und Methylphäophorbid zugrunde liegende Carbonsäure ist.

Lösung von 0.030 g Lactamhydrat in 1 l Äther (etwa $^1/_{1000}$ in 20 l).

Schicht in mm	2,5	10	20	40
Band I	672— —661	678—655	679—652 | 635	683—648.632
„ II	—	616 | 602	617..603	617...603
„ III	—	—	563 | 553	564·553
„ IV	535·527	535··527	535···527	537— —527
„ V	508..492	509...491	510— —490	512—488
Endabsorption	411—	427—	432—	437—

Phytorhodin g weist ein schönes Spektrum von noch einfacherer Gliederung auf: der stärkste Absorptionsstreifen der sichtbaren Region liegt wie durchwegs bei den Chlorophyllderivaten im Rot, aber nahe am Übergang in Orange; im Grün liegt ein kräftiges Doppelband, außerdem gibt es nur noch im Orange ein schwächeres, viertes Band. Die Reihenfolge der Bänder nach ihrer Intensität ist demnach: Endabsorption, I, IV, III, II.

Mit dem viel komplizierteren Spektrum der Phäophorbide b ist das relativ einfache Phytorhodinspektrum sehr nahe verwandt.

[1]) Abh. XVII.

Die Abweichungen bestehen nämlich nur darin, daß das auf der Fraunhoferschen Linie F liegende Band VI der Komponente b hier fehlt und die charakteristische dreiarmige Absorption im Grün ohne Änderung des Ortes zu einem Doppelstreifen verschmolzen ist.

Viel bedeutender sind natürlich die Unterschiede gegenüber dem Phytochlorin e; beim Rhodin sind die zwei Bänder im Rot und Orange gegen Violett hin verschoben; statt der über das ganze Grün verteilten drei Streifen zeigt das Rhodin nur zwei kräftige Bänder.

Lösung von 0,030 g Rhodin in 1 l Äther (etwa $^1/_{1000}$ Mol. in 20 l).

Schicht in mm	2,5	10	40	80
Band I	659..649	662—649	667—641	673—636
„ II	602 | 595	603.594	607...592	608— —590
„ III	568 | 555	569.554	570...553	576— —552
„ IV	537.517	536..518	539— —516	541—509
Endabsorption	446—	451—	455—	459—

Bildung komplexer Kaliumverbindungen [1]).

Die Spaltungsprodukte der Chlorophylle vermögen mit Alkalihydroxyd Verbindungen einzugehen, die in überraschendem Maße an die natürlichen Magnesiumverbindungen erinnern. Die Alkalisalze von Chlorin und Rhodin zeigen in alkoholischer Lösung recht genau die Absorptionsspektra der magnesiumfreien Chlorophyllabkömmlinge, aus welchen diese hervorgegangen sind, nämlich das Chlorinalkali stimmt mit der Komponente a des Phäophytins, das Rhodin mit b überein. Löst man hingegen Phytochlorin und Phytorhodin in konzentriertester alkoholischer Kalilauge auf oder besser, dampft man ihre Lösung in 30prozentiger methylalkoholischer Kalilauge bis auf einen Gehalt von 45% KOH ab, so schlägt die Farbe vollkommen um in intensives Chlorophyllgrün, und zwar in einem Fall in das Blaugrün der Komponente a, im andern Fall in das Gelbgrün der zweiten Komponente.

Die so gebildeten Kaliumverbindungen vergleichen wir mit Iso-Chlorophyllinsalz a und b. Diese stimmen in höchst konzentrierter methylalkoholischer Kalilauge als Lösungsmittel in den

[1]) Ann. d. Chem. 385, 180 [1911].

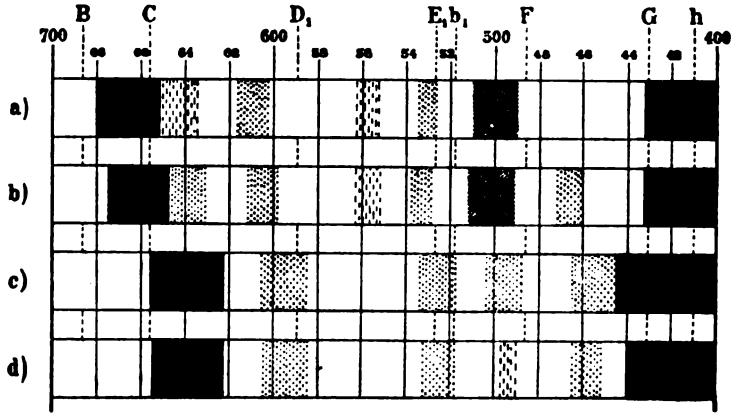


Fig. 11.

$^1/_{1000}$ Mol. in 20 l; Schicht 20 mm.

a) Phytochlorin e in Äther;
b) Phytochlorin e in 5 prozentiger methylalkoholischer Kalilauge;
c) Phytochlorin e in 45 prozentiger methylalkoholischer Kalilauge;
d) Isochlorophyllin a in 44 prozentiger methylalkoholischer Kalilauge.

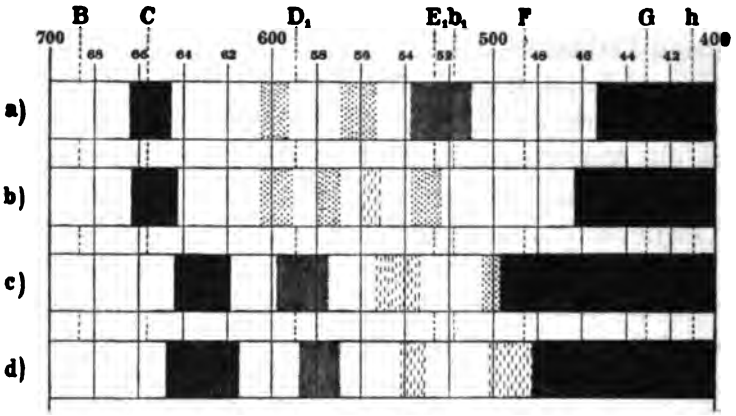


Fig. 12.

$^1/_{1000}$ Mol. in 20 l; Schicht 20 mm.

a) Phytorhodin g in Äther;
b) Phytorhodin g in 5 prozentiger methylalkoholischer Kalilauge;
c) Phytorhodin g in 48 prozentiger methylalkoholischer Kalilauge;
d) Isochlorophyllin b in 45 prozentiger methylalkoholischer Kalilauge.

Absorptionserscheinungen überein mit Chlorin und Rhodin in denselben Medien, und zwar so vollkommen, daß man das einwertige Alkalimetall analog dem Magnesium im Chlorophyll gebunden annehmen muß.

Dieser Metallkomplex, der unbeständigste, den die Chlorophyllderivate bilden, erleidet schon beim Verdünnen der alkalischen Masse mit Alkohol Dissoziation.

Die Figuren 11 und 12 veranschaulichen die Absorptionsspektra von Chlorin und Rhodin neben ihren normalen und komplexen Alkaliverbindungen und den entsprechenden Isochlorophyllinen.

4. Die schwach basischen Phytochlorine und Phytorhodine.

Phytochlorin f[1]).

Wenn das Chlorophyll beim Stehen mancher Extrakte einer Veränderung unterliegt, so daß die braune Phase verloren geht, dann liefert öfters die Phäophytinhydrolyse das Phytochlorin f, welches Willstätter und Hocheder [2]) zuerst bei der Verarbeitung von Ulva lactuca isoliert haben. Das Auftreten dieses Spaltungsproduktes ist nicht für den Extrakt der genannten Pflanze spezifisch, vielmehr kommt die gleiche Veränderung des Chlorophylls auch bei anderen Extrakten vor und sie wird namentlich bei Brennesseln oft beobachtet. Nur aus ungereinigten Extrakten haben wir Phytochlorin f erhalten, hingegen nicht bei einem Versuch, für welchen die Blätter mit Benzol und Petroläther vorbehandelt waren. Auch in gereinigten petrolätherischen Lösungen hat sich das Chlorophyll nicht derart geändert, daß der Abbau zum Phytochlorin f führte, sondern statt dessen zu dem in der Basizität ähnlichen, im übrigen ganz verschiedenen Phytochlorin g.

Aus Chlorophyllin ist das Phytochlorin f noch nicht erhalten worden.

Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung dieses Phytochlorins

---

[1]) Abh. XVI.
[2]) Ann. d. Chem. 354, 237 [1907].

haben uns oft Phäophytinpräparate aus Brennesselextrakten gedient, die nach dem Abfiltrieren vom Mehle vor dem Ansäuren einige Zeit gestanden hatten. Nach der Verseifung wurde das Gemisch der Spaltungsprodukte mit Salzsäure fraktioniert, um das Chlorin f von reichlich beigemischtem Phytochlorin e und von Phytorhodin g zu trennen. Das Phytochlorin f ist mit Salzsäure von 11% ausgeschüttelt und dann aus seiner durch Waschen mit Äther von etwas Phytorhodin i und k befreiten und auf 7—8% Chlorwasserstoffgehalt verdünnten Lösung wieder ausgeäthert worden. Beim Einengen des Äthers schied sich das Chlorin als violettschwarze Krystallisation von rhombenförmigen, in der Durchsicht olivbraunen Täfelchen aus (Tafel IV, Fig. 5); das einmal isolierte Präparat krystallisiert aus Äther in schönen Krystalldrusen strahlenförmig angeordneter Prismen.

Phytochlorin f, $[C_{31}H_{33}N_4](CO)(COOH)_2$, ist isomer mit der wasserfreien Form des Phytochlorins e. Sein Verhalten gegen Ammoniakgas, wovon es nur halb so viel aufnimmt wie Chlorin e, scheint darauf hinzudeuten, daß in ihm eine Dilactammonohydratmonocarbonsäure vorliegt.

Chlorin f ist in allen üblichen Solvenzien äußerst schwer löslich. Nur in Pyridin, sowie in Ameisensäure finden wir es leicht löslich, natürlich unter Salzbildung, und zwar in der letzteren mit rein blauer Farbe. Die mittels des Ammonsalzes bereitete Ätherlösung ist schön grün, viel weniger olivstichig, als die Lösung von Chlorin e, die Farbe in Salzsäure von 11% (die Salzsäurezahl ist genauer 10) ist rein blau, während Phytochlorin e in der Säure von dieser Konzentration grünlichblaue, Chlorin g blaugrüne Farbe zeigt. Aus der Ätherlösung geht das Phytochlorin f in Ammoniak von derselben großen Verdünnung wie Chlorin e, aber zum Unterschied von diesem mit rein grüner Farbe.

Chlorin f bildet ein schön krystallisiertes Cäsiumsalz, das mit Methylsulfat einen in Tafeln oder in Prismen krystallisierenden Ester liefert.

Beim Abbau mit konzentrierten Alkalien in der Hitze geht Phytochlorin f in Rhodoporphyrin und weiterhin in Pyrroporphyrin über (siehe Kap. XX, Abschn. 4).

Phytochlorin g[1]).

Es ist ein in der Basizität dem Phytochlorin f ähnliches Spaltungsprodukt, das beim Abbau von Chlorophyll sehr häufig auftritt. Seine Zusammensetzung wird der von Phytochlorin e und f sehr nahe stehen. Es kann sich bei der empirischen Formel nur um eine Differenz von H_2O handeln. Da die Verbindung leicht veränderlich ist, gelang es noch nicht, sie zu analysieren; es war aber wichtig, ihre Bildungsweisen zu beobachten und ihre Merkmale festzustellen.

Aus unversehrtem Chlorophyll entsteht Phytochlorin g:

1. Bei der Verseifung von Phäophytin, wenn dasselbe in ätherischer Lösung mit alkoholischer Lauge behandelt wird.

2. Bei der Spaltung mit Säure aus dem mit alkoholischer Lauge in der Kälte gewonnenen Chlorophyllinsalz. Die isolierte Chlorophyllkomponente a liefert durch Auflösen in Alkohol oder Pyridin und Eintragen in kalte alkoholische Lauge auch ein Chlorophyllin, das bei der Zersetzung mit Mineralsäure Phytochlorin g bildet.

Ferner entsteht dieses Phytochlorin g aus verändertem Chlorophyll; in alkoholhaltiger petrolätherischer Lösung verwandelt sich beim Stehen die Komponente a derart, daß ihre Phäophytinhydrolyse dieses Chlorin liefert. Auf gleiche Weise geht es aus den in alkoholischen Lösungen gebildeten leicht löslichen Derivaten des Äthylchlorophyllids hervor.

Zur Gewinnung haben Willstätter und Utzinger die petrolätherische Rohlösung der Chlorophyllkomponente a mit alkoholischem Kali verseift und die alkalische Flüssigkeit mit Salzsäure angesäuert. Dann ist das Spaltungsprodukt ausgeäthert und von etwas beigemischtem Chlorin e mit 6 prozentiger Salzsäure befreit worden.

Die zurückgebliebene ätherische Lösung von Phytochlorin g ist olivgrün, ähnlich wie Chlorin e, während Chlorin f rein grün ist. Beim Stehen wird die Lösung durch Zersetzung braun und braunrot. Die Salzsäurezahl ist 10—11.

Beim Eindunsten schlägt die Farbe der Ätherlösung leicht in braunstichiges Rot um. Charakteristisch für das Phytochlorin g

[1]) Abb. XVI.

ist der Farbumschlag beim Abdampfen und kurzem Erhitzen mit Alkohol. Dabei entsteht eine sehr schöne, aber sehr unbeständige, in indifferenten Lösungen rote, den Phytorhodinen ähnliche Verbindung. Sie ist stark basisch, so daß sie aus Äther schon in 1 prozentige Salzsäure und schon in schwach angesäuertes Wasser mit hell meergrüner Farbe übergeht; übrigens wird sie auch von alkoholhaltigem Wasser dem Äther entzogen. In verdünntem Ammoniak löst sie sich mit roter Farbe.

Beim Erhitzen mit alkoholischem Kali auf 140—150° gibt Phytochlorin g ein dem Glaukoporphyrin nahestehendes Porphyrin, bei 225—230° reines Pyrroporphyrin.

Die Phytorhodine i und k[1]).

Analog wie in der a-Reihe bilden sich aus Chlorophyll b durch Verseifen in der Kälte und Abspaltung des Magnesiums oder durch Allomerisation und darauffolgende Spaltung auf verschiedenen Wegen statt Phytorhodin g zwei schwächer basische Produkte, Phytorhodin k und i. Diese lassen sich nur auf Grund eines kleinen Unterschiedes in ihren basischen Eigenschaften durch eine sorgfältige Fraktionierung nach der Methode von Willstätter und Mieg trennen, und zwar mit 14prozentiger Salzsäure: die Salzsäurezahl von Rhodin k ist nämlich 14—14½, von i 15—16.

Viele Bildungweisen ergeben Gemische von Rhodin k und i, häufig überwiegend k.

Bei der Verseifung von Phäophytin oder Methylphäophorbid b, zweckmäßig einer verdünnten ätherischen Lösung mit methylalkoholischem Kali in der Kälte entsteht viel Rhodin k, daneben wenig i.

Chlorophyll oder Methylchlorophyllid b lieferten bei der Verseifung in kalter Lauge etwa zur Hälfte starkbasisches Rhodin, zur Hälfte die zwei schwächer basischen.

Die Allomerisation von Chlorophyll b gibt ein ergiebiges Ausgangsmaterial für die schwachbasischen Rhodine. Bei der Verseifung in alkoholischer Lösung allomerisierter Präparate mit

[1]) Abh. XVI und XXII.

Lauge erhalten wir neben überwiegendem Produkt k wenig i; besonders groß war der Anteil von Rhodin k, wenn das allomerisierte Chlorophyll zuerst mit Säure, dann mit Alkali gespalten wurde.

Bei der Allomerisation von Chlorophyll b in Petroläther entstanden hingegen Lösungen, die bei der Einwirkung von methylalkoholischer Kalilauge und darauffolgendem Ansäuern zu reichlichen Mengen der beiden schwachbasischen Derivate führten.

Die Fraktionierung der Spaltungsprodukte mit Salzsäure aus ätherischer Lösung ist wegen der Beimischung stärkerer Basen und infolge des kleinen Unterschiedes in der Basizität umständlich. Durch sehr oft wiederholtes Ausschütteln mit wenig 13 prozentiger Salzsäure werden die stärksten Basen entfernt, 14—14½-prozentige Säure extrahiert dann Rhodin k und 17 prozentige Phytorhodin i. Die beiden Spaltungsprodukte werden aus den mit Äther gewaschenen salzsauren Auszügen durch Verdünnen wieder in Äther übergeführt und durch Schütteln mit 12½- bzw. mit 14½ prozentiger Salzsäure von stärkeren Basen vollständig befreit. Aus den mit Wasser gewaschenen und eingeengten ätherischen Lösungen krystallisieren die reinen Rhodine in unscharf begrenzten Blättchen.

In der Zusammensetzung $C_{34}H_{32}O_6N_4$ stimmen Phytorhodin k und i überein, sie scheinen sich von Phytorhodin g durch das Minus von 1 Mol. Wasser zu unterscheiden.

Die Löslichkeit der Phytorhodine in Äther ist sehr gering, in Alkohol sind sie in der Kälte schwer, in der Wärme ziemlich leicht löslich. Ihre ätherischen Lösungen sind weniger rot als die von Phytorhodin g, mehr braunstichig; bei Phytorhodin k ist die Nuance ein wenig mehr rot als bei i.

In 20 prozentiger Salzsäure lösen sie sich mit lichtgrüner, in Ammoniak mit brauner Farbe. Mit verdünnter methylalkoholischer Kalilauge gibt k eine schön rote, i eine gelbe Lösung.

Beim Versetzen mit wenigen Tropfen konzentrierter Salpetersäure wird die alkoholische Lösung von Rhodin k tiefblau, diejenige von i braunrot.

XVII. Phytol.

1. Gewinnung und quantitative Bestimmung.

Nach Willstätter und Hocheder[1]) wird Phäophytin wie irgend ein anderes Wachs von alkoholischer Kalilauge leicht verseift; Chlorophyll verhält sich ebenso.

Während die Zusammensetzung der sauren Komponente, nämlich der empfindlichen stickstoffhaltigen Spaltungsprodukte ungemein abhängig ist von den Bedingungen der Verseifung, beeinflussen diese im allgemeinen gar nicht die Zusammensetzung des abgespaltenen Alkohols und nur wenig die Ausbeute an demselben. Nur bei einem Verfahren, der Methanolyse des Phäophytins mit Chlorwasserstoff in Holzgeist[2]), wird das Phytol in veränderter Form gewonnen, nämlich in der Hauptsache als Phytolmethyläther.

Die Frage, ob das Phytol als solches dem Molekül des Farbstoffs angehört, konnte nach der Isolierung des Chlorophylls gelöst werden; es hat sich gezeigt, daß der ungesättigte Alkohol nicht etwa erst unter den Bedingungen der Verseifung von Phäophytin aus einem gesättigten Glykol hervorgeht. Willstätter und Hug[3]) haben nämlich das Phytol aus dem Chlorophyll unter den gelinden Bedingungen der Alkoholyse mittels der Chlorophyllase abgespalten und mit besonderer Vorsicht isoliert. Die Jodzahl stimmte, der abgespaltene Alkohol war reines Phytol.

Für die Gewinnung des Phytols durch Verseifen von Phäophytin mit alkoholischer Lauge haben wir im 1. Abschn. des XVI. Kap. zwei Verfahren angegeben, die Ausführung in der Wärme und in der Kälte; an jener Stelle ist die Extraktion des Phytols aus dem Reaktionsprodukte bereits beschrieben worden.

[1]) Ann. d. Chem. 354, 240 [1907].
[2]) Kap. XV, 3. Abschn.
[3]) Kap. IX, 1. Abschn.

Die ätherischen Lösungen sind zunächst braun gefärbt durch eine kleine Beimischung von stickstoffhaltigen Substanzen, die sich am besten durch aufeinanderfolgende Behandlung mit Alkali, Salzsäure und Tierkohle beseitigen lassen. Zunächst schüttelt man die Ätherlösung mit sehr verdünnter Lauge durch und eine Reihe von Malen anhaltend mit wenig konzentrierter Salzsäure, die sich blaugrün anfärbt. Dann wird der Äther oft mit viel Wasser gewaschen und eingeengt, z. B. beim Verarbeiten von 200 g Phäophytin auf 1,5 l. Schließlich werden die letzten färbenden Verunreinigungen durch stundenlanges Schütteln mit guter reiner Tierkohle an der Maschine entfernt. Die ätherische Lösung trocknet man mit Natriumsulfat, dann wird sie konzentriert und im Vakuum ganz eingedampft. Um die letzten Spuren vom Lösungsmittel zu verjagen, erwärmt man den Eindampfrückstand mit eingetauchter Capillare $^3/_4$ Stunden lang im Vakuum auf 90°.

Die Tierkohle hält etwas Phytol zurück; es lohnt sich, sie zu sammeln und sie besonders mit Äther zu extrahieren, sie gibt aber nur einen Teil des absorbierten Phytols (nämlich 0,1—0,5% vom Phäophytin) wieder ab.

Für die Absorption des Phytols durch Tierkohle ist folgender Versuch von Interesse: 5,7 g Phytol wurden in 0,5 l Äther mit 11 g getrockneter Tierkohle 5 Stunden geschüttelt; die Tierkohle hatte 1,38 g Phytol aufgenommen. Bei sechsstündigem Kochen mit 0,5 l Äther gab sie nur 0,54 g Phytol wieder ab.

Die Isolierung des Phytols, von dem einige Kilogramm gewonnen wurden, ist beinahe quantitativ; die Ausbeute beträgt fast ein Drittel vom Phäophytin.

Die theoretische Phytolzahl, d. h. der berechnete Phytolgehalt in Prozenten, beträgt:

für Phäophytin a 33,7, für Phäophytin b 33,2;
für das Gemisch mit dem Komponentenverhältnis 2,5: 33,56;
für Chlorophyll mit dem Komponentenverhältnis 2,5: 32,66.

Für die quantitative Bestimmung[1]) des Phytols, die bei der vergleichenden Untersuchung des Chlorophylls verschiedener Pflan-

[1]) Ann. d. Chem. 371, 18 [1909] und 378, 31 [1910].

zen eine wichtige Rolle gehabt hat, dient im wesentlichen dasselbe Verfahren wie bei der Gewinnung in großem Maßstab.

Wir verwenden dafür 0,3—1 g, gewöhnlich etwa 0,5 g Phäophytin oder Chlorophyll. Die fein zerriebene Substanz wird mit 24prozentiger methylalkoholischer Kalilauge (5—6 ccm für 1 g) 2 Stunden lang im Wasserbad gekocht, und zwar in einem reagensglasähnlichen Gefäß (30—40 ccm Inhalt) mit verjüngtem Hals und aufgeschliffenem Kühlrohr bei den kleinen Mengen, im Rundkölbchen mit aufgeschliffenem Kühler bei etwas größeren Mengen von Farbstoff. Dann wird das Phytol fünf- bis sechsmal mit Äther extrahiert, am bequemsten im nämlichen Gefäß ohne Zusatz von Wasser, indem man die Masse, welche zäh wird, jedesmal mit dem Äther gut verrührt und anschüttelt und den Äther einfach dekantiert. Man kann natürlich auch die alkalische Flüssigkeit mit Wasser in einen Tropftrichter spülen und hier ausäthern; aber diese Arbeitsweise ist zeitraubender, weil oft Emulsionen auftreten. Die vereinigten ätherischen Lösungen werden nur mit Wasser mehrmals gewaschen und mit geglühtem Natriumsulfat getrocknet. Dann werden sie mit reiner, aber nicht besonders getrockneter Tierkohle 15 Minuten geschüttelt, und zwar bei einer Konzentration von 200 ccm für 1 g angewandtes Phäophytin mit 0,1 g Tierkohle. Wir wenden immer dieselbe Menge Tierkohle und gleiche Konzentration der ätherischen Lösung an, um den Phytolverlust infolge der Absorption durch die Kohle möglichst gleichmäßig zu machen.

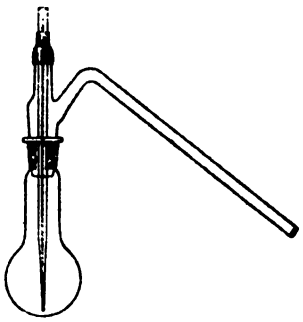


Fig. 13. Helmkölbchen.

Die abermals filtrierte Lösung wird im Helmkolben mit haarfeiner Capillare im Wasserbade eingedampft; endlich spült man den Rückstand mit wenig Äther in ein tariertes, leichtes 15 ccm-Wägekölbchen mit langem Halse (um Verspritzen auszuschließen) und gleichfalls mit aufgeschliffenem Helm (siehe die Figur 13). Der Äther wird durch $^3/_4$ Stunden langes Erwärmen im Vakuum auf 90° mit eingetauchter Capillare zur Gewichtskonstanz verjagt und das Phytolkölbchen auf der analytischen Wage gewogen.

Der Fettgehalt des Kahlbaumschen Äthers bewirkte gewöhnlich einen Fehler von ungefähr +0,2% bei Anwendung von 0,5 g Phäophytin und kompensierte wohl den unvermeidlichen Phytolverlust bei der Isolierung.

Je 200 ccm Äther lieferten nämlich 0,0033 und 0,0028 g fettigen Rückstand; bei Ausführung aller Reinigungsmanipulationen wie bei einer Phytolbestimmung betrug aber der Rückstand 0,0012 g. Da aber manche Handelssorten von Äther viel mehr Rückstand enthalten, ist es vorzuziehen, für die Bestimmungen frisch gereinigten und destillierten Äther anzuwenden.

Bei wiederholten Bestimmungen differierten die Werte sehr wenig, wie die folgenden Beispiele zeigen.

Ein Phäophytinpräparat aus Heracleum gab bei zwei Bestimmungen die Phytolzahl 29,5 und 29,6 (0,5201: 0,1537 g; 0,5315: 1573 g); ein weitergehend alkoholysiertes Präparat gab die Phytolzahlen 23,0 und 23,2 (0,5433: 0,1252 g; 0,3731: 0,0857 g); ein anderes die Werte 25,6 und 25,7 (0,4213: 0,1080 g; 0,3102: 0,0798 g).

2. Beschreibung[1]).

Das Phytol ist ein ungesättigter primärer Alkohol der Fettreihe von der Formel $C_{20}H_{39}OH$; seine Kohlenstoffkette enthält Verzweigungen.

Es ist ein farbloses, ziemlich dickes Öl, das sich mit allen üblichen organischen Lösungsmitteln mischt. Es siedet unter vermindertem Druck unzersetzt; die Destillation[2]) im Hochvakuum ist seine beste Reinigung.

Siedepunkt unter 0,03—0,04 mm Druck 145°, unter 9—10 mm 203—204°.

$$D_4^0 = 0{,}864,\ d_4^{20} = 0{,}852;\ n_D^{20} = 1{,}46380.$$

Phytol ist autoxydabel und verbindet sich leicht mit Ozon; es addiert ein Molekül Brom (gefunden 1,05 statt 1 Mol.) und gibt

[1]) Abh. III u. XII.

[2]) Für die Vakuumdestillation von hochsiedenden Substanzen verwenden wir vorteilhaft Kolben von einer Entenform (Fig. 14), die nicht viel schädlichen Raum aufweisen und doch kein Überspritzen vorkommen lassen.

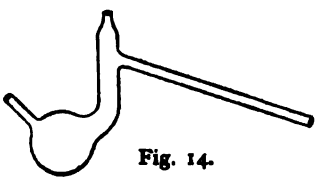


Fig. 14.

eine damit genau übereinstimmende Jodzahl (gefunden 90,5 und 91,2 statt ber. 85,5).

Das Natriumsalz des Phytols ist leicht löslich in Äther. Mit Phenylcyanat bildet Phytol ein krystallisierendes Urethan vom Schmelzpunkt 26—29°. Mit Phthalsäureanhydrid verbindet es sich zu einer Estersäure, deren charakteristisches Silbersalz in Äther sowie in Benzol leicht löslich ist und in Prismen vom Schmelzpunkt 119° krystallisiert.

Durch Behandeln mit Wasserstoff bei Gegenwart von Platin läßt sich der ungesättigte Alkohol zum gesättigten hydrieren. Dihydrophytol ($C_{20}H_{42}O$) ist ein mit den organischen Solvenzien mischbares Öl vom Siedepunkt 201,5—202° unter 9,5 mm Druck; $D_4^0 = 0{,}849$, $n_D^{20} = 1{,}45213$.

Durch Erhitzen von Dihydrophytol mit Natronkalk entsteht die Phytansäure ($C_{20}H_{40}O_2$), ein schwer bewegliches Öl vom Siedepunkt 221° unter 7,5 mm Druck.

Der Stammkohlenwasserstoff des Phytols von der Formel $C_{20}H_{42}$, Phytan, tritt als Nebenprodukt der Hydrierung des ungesättigten Alkohols auf; er ist eine in Methylalkohol und Eisessig wenig lösliche, leicht bewegliche Flüssigkeit vom Siedepunkt 169,5° unter 9,5 mm Druck.

Bei der Oxydation von Phytol mit Chromsäure oder beim Verkochen seines Ozonides wird die Kohlenstoffkette zwischen dem dritten und vierten Kohlenstoffatom gespalten. Dabei entsteht das Keton $C_{17}H_{34}O$, ein mit den üblichen Lösungsmitteln mischbares Öl vom Siedepunkt 175° (bei 11 mm) und $d_4^0 = 0{,}844$. Die für dieses Keton zuerst angenommene Formel $C_{18}H_{36}O$ ist als unrichtig erkannt worden. Die Nachprüfung[1]) der veröffentlichten Arbeit hat ergeben, daß aus rohem und aus destilliertem Phytol stets das nämliche Keton $C_{17}H_{34}O$ in mehr oder weniger reinem Zustand entsteht und sie hat die Annahme von Willstätter, Mayer und Hüni[2]) widerlegt, daß bei der Destillation des Phytols die Doppelbindung wandere.

---

[1]) O. Schuppli, Beiträge zum Abbau des Phytols; Promotionsarbeit Zürich 1912.

[2]) Abh. XII.

XVIII. Die Chlorophyllinsalze.

Mit den Chlorophyllinen ist es zuerst gelungen, Aufschlüsse über die Zusammensetzung des Chlorophylls zu gewinnen[1]). Ihre saure Natur ermöglichte eine Reinigung mit chemischen Mitteln, nämlich die Überführung aus ätherischer Lösung in Dinatriumphosphat als Alkali und Entbindung aus dieser Lösung mit Mononatriumphosphat als Säure. Auf diese Weise einigermaßen gereinigt, haben die Chlorophylline die Bedeutung des Magnesiums für die Zusammensetzung des Blattfarbstoffs erkennen lassen.

Bei der Einwirkung der Alkalien auf die zwei Chlorophyllkomponenten wird die leicht verseifbare Phytyl- und die schwer verseifbare Methylestergruppe hydrolysiert. Die entstehenden Chlorophylline sind als magnesiumhaltige freie Carbonsäuren sehr zersetzlich, sie werden daher in Form der Salze untersucht und für den Abbau angewandt.

Bei dieser Reaktion mit den Alkalien erfolgt unvermeidlich noch eine weitere Veränderung, nämlich eine Umwandlung von Lactamgruppen, die in einer Richtung verläuft, wenn die Verseifung in der Hitze, in einer anderen Richtung, wenn sie unter den gelindesten Bedingungen in der Kälte ausgeführt wird, und oftmals nach beiden Richtungen zugleich (siehe S. 27 u. ff.).

Erst nachdem in einer Untersuchung von Willstätter und Utzinger[2]) die Abhängigkeit der Verseifungsprodukte von den Bedingungen genau erkannt worden war, gelang es, je zwei einheitliche Chlorophylline der a- und b-Reihe zu unterscheiden und zu untersuchen.

1. Die rasche Verseifung in der Hitze führt zu den Isochlorophyllinen a und b. Sie haben den Namen Isoverbindungen be-

[1]) Abh. II.
[2]) Abh. XVI.

kommen müssen, weil sie erst viel später dargestellt werden konnten, als die Produkte der kalten Verseifung, nämlich erst zu einer Zeit, da reine Alphylchlorophyllide zugänglich geworden waren. Gerade aus den Isochlorophyllinen gehen einfach beim Austritt des Magnesiums die wichtigsten Derivate der Chlorophyllkomponenten hervor:

Isochlorophyllin a liefert nämlich beim Eliminieren des Magnesiums mit Säure Phytochlorin e, Isochlorophyllin b auf gleiche Weise Phytorhodin g.

Der Abbau der beiden Isochlorophylline mit Alkalien bei höherer Temperatur führt zum Phyllophyllin.

Die Isochlorophyllinsalze zeichnen sich durch eine ähnliche Fluorescenz aus wie Chlorophyll, während die Salze der anderen Reihe, die Chlorophyllinsalze, nicht fluorescieren.

2. Die Verseifung in der Kälte läßt sich so leiten, daß die reinen Chlorophylline a und b entstehen. Sie liefern bei der Zersetzung mit Säure schwach basisches, leicht veränderliches Phytochlorin g und schwach basische Phytorhodine, Verbindungen, welche für den Abbau des Chlorophylls erst in zweiter Linie Bedeutung erlangt haben.

Die Chlorophyllinsalze selbst sind aber wertvoll als Ausgangsmaterial für Pyrrophyllin.

Bei der Verseifung in der Kälte erfolgte stets nebenher in störendem Maße die Bildung der Isoverbindungen. Deshalb ist eine neue Methode von Nutzen, welche gerade die Chlorophylline rein darzustellen ermöglicht. Sie besteht darin, daß zuerst das Chlorophyll durch Stehen in schwach alkalischer alkoholischer Lösung allomerisiert, d. h. umlactamisiert und darauf in der Kälte gelinde verseift wird. Dann ist nur noch die Schwierigkeit zu beachten, daß bei dieser vorsichtigen Verseifung das Chlorophyllin leicht methoxylhaltig bleibt.

1. Verseifung in der Hitze[1]).

Die Verseifung in der Hitze, die für die Gewinnung von Abbauprodukten neue Möglichkeiten eröffnet hat, ließ sich nicht mit

[1]) Unveröffentlicht.

dem Chlorophyll in der verdünnten Form der Extrakte ausführen; sie konnte daher erst dann zur Anwendung kommen, als isoliertes Chlorophyllid oder Chlorophyll dafür zur Verfügung stand.

Im Kap. XVI, Abschn. 2, ist die Bildung der Isochlorophyllinsalze erwähnt worden mit Rücksicht auf die Darstellung von Phytochlorin e und Phytorhodin g aus denselben. Um die Kaliumsalze für den Abbau zu Phyllinen (Phyllophyllin) und Porphyrinen zu verwenden, wofür sie ein wichtiges Ausgangsmaterial bilden, gewinnen wir sie auf ähnliche Weise, ohne sie aus der alkalischen Lösung abzuscheiden.

10 g Methylchlorophyllid (a + b) oder ebensogut 15 g reines oder auch rohes Chlorophyll werden gepulvert und in Portionen von 2 g in 250 ccm siedende 35prozentige methylalkoholische Kalilauge eingetragen. Die Lauge bereiten wir in einer silbernen Flasche mit eingeschliffenem silbernem Stopfen durch Auflösen von 350 g mit Alkohol gereinigtem Ätzkali in 650 g Methylalkohol.

Für die Verseifung bringen wir, um Verunreinigung durch das Zink der Glasgefäße zu vermeiden, die Kalilauge in einen silbernen Tiegel von 600 ccm Inhalt, wie er als Autoklaveneinsatz verwendet wird, und legen um den oberen Rand des Bechers außen eine Kühlschlange von Blei, um die Holzgeistdämpfe zu kondensieren. Beim Eintragen der Substanz rühren wir mit dem Silberspatel kräftig um und achten darauf, daß nichts an den Wänden klebt. Mit gelindem Sieden fahren wir fünf Minuten fort, ohne Holzgeist abzudampfen. Die gebildete Isochlorophyllinsalzlösung ist grünschwarz und wird beim Verdünnen tiefgrün mit prachtvoller Fluorescenz.

Das Verseifungsprodukt enthält ausschließlich die zwei Isokaliumverbindungen; es gibt beim Ansäuren, Ausäthern und Fraktionieren nur die stark basischen Derivate. Nach dem Durchschütteln mit 9prozentiger Salzsäure liefert ein Auszug mit 12prozentiger Säure, in Äther übergeführt, eine rein rote Lösung.

Einheitliches Isochlorophyllinkalium a

haben Willstätter und Forsén in Substanz abgeschieden. Reines Methylchlorophyllid a wurde in Mengen von 1 g mit 25 ccm sieden-

der konzentrierter methylalkoholischer Kalilauge übergossen. Die gelbe Phase tritt sofort auf und verschwindet augenblicklich. Es war schwer, das Verseifungsprodukt ganz methoxylfrei zu gewinnen; um dies zu erreichen, wurde fünf Minuten zu schwachem Sieden erhitzt, dann 2—3 ccm Wasser hinzugefügt und das Kochen noch einige Minuten fortgesetzt. Zwei solche Portionen vereinigte man und verdünnte sie mit Wasser auf 200 ccm. In diese Lösung wurde dann ein mit Chlorkalium gefülltes Leinwandbeutelchen so lang eingetaucht, bis alles Isochlorophyllinsalz in großen hellgrünen Flocken gefällt und die Flüssigkeit fast entfärbt war. Die Mutterlauge dekantierte man und sammelte das Produkt mit etwas Talk. Hieraus ist nach dem Trocknen und Pulverisieren die Kaliumverbindung mit 200 ccm siedendem Holzgeist ausgezogen worden. Die blaue, stark fluorescierende Lösung engten wir rasch im Vakuum auf 10 ccm ein, versetzten sie mit 100 ccm absolutem Äthylalkohol und konzentrierten zur vollständigen Entfernung des Methylalkohols die Flüssigkeit auf das halbe Volumen. Bei zweistündigem Stehen in der Kältemischung scheidet sich die Kaliumverbindung dunkelblau, grobkörnig fast in ihrer ganzen Menge aus (1,8 g). Sie enthält noch etwas anorganische Beimischung und wird erst durch nochmaliges Umfällen aus Methyl- mit Äthylalkohol chlorfrei. Man schüttelt die Substanz in der Kälte mit 100 ccm Holzgeist an und läßt dabei einen Anteil von 0,2 g ungelöst. Die Lösung wird wieder unter vermindertem Druck stark eingedampft und mit 100 ccm Äthylalkohol vermischt; dann scheidet sich beim Stehen im Kühlraum 0,9 g schönes Isochlorophyllinkalium als dunkelblaues Pulver ab.

Das Salz ist frei von Methoxyl und enthält 16% Kalium und 3% Magnesium, entsprechend den Formeln $[C_{31}H_{31}N_4Mg](COOK)_2$ oder $[C_{31}H_{30}N_4Mg](COK)(CO_2K)_2$. Es ist in Methylalkohol ziemlich leicht löslich mit grünblauer Farbe, in Äthylalkohol und anderen organischen Solvenzien heiß wie kalt schwer, in Wasser leicht löslich.

Das reine Isochlorophyllinkalium b haben Willstätter und Fischer in Lösung erhalten, indem sie 0,3—0,8 g Methylchlorophyllid b, gelöst in 1—2,5 ccm Pyridin, in 3—8 ccm siedende methylalkoholische Lauge eintrugen und zur vollständigen Ver-

seifung noch fünf Minuten über einer kleinen Flamme, ohne stark einzukochen, erhitzen.

2. Verseifung in der Kälte.

Solange kein anderes Ausgangsmaterial als Rohchlorophyll-lösungen für die Gewinnung der Chlorophyllinsalze existierte, ist die Verseifung in der Kälte folgendermaßen geleitet worden.[1])

Die Perkolate oder Doppelextrakte wurden in bedeutenden Chargen in große, mit gut aufgeschliffenen Deckeln versehene Steinzeugtöpfe eingefüllt, aus welchen man das Kaliumsalz nach dem Ablassen der Mutterlauge mit kräftigen Silberspateln bequem abschaben konnte. Die innere Wand des Zylinders ist glatt gearbeitet; 10 ccm über dem Boden besitzt das Gefäß einen Tubus.

Die Verseifung wurde mit 20 ccm konzentrierter (28 prozentiger) methylalkoholischer Kalilauge pro Kilogramm Planzenmehl bewirkt. Man vermischte den Extrakt mit der Lauge unter kräftigem Schütteln. Das Ende der Verseifung war daran zu erkennen, daß sich aus einer Probe beim Durchschütteln mit Wasser und Äther eine rein gelbgefärbte Ätherschicht absetzte. Die Reaktion, die bei kleinen Proben mit Überschuß von Alkali fast momentan verläuft, erforderte hier einige Stunden. In dieser Zeit fiel noch gar kein Chlorophyllin aus, sondern es bildete sich in großer Menge ein dunkelgefärbter, harziger, von Chlorophyllsubstanz beinahe freier Niederschlag, von dem man die Lösung in einen anderen Dekantiertopf umfüllen mußte. Sie blieb dann zur Abscheidung des Chlorophyllins gutverschlossen 7—10 Tage lang stehen.

Der zähe Niederschlag von Chlorophyllinkalium wurde mit absolutem Alkohol angerieben und ausgewaschen und im Exsiccator getrocknet. Es bildete danach eine blauschwarze, harte, hygroskopische Masse.

Die Ausbeute von 100 kg Brennesseln betrug 306—321 g Kalium salz, das meistens 47—56 prozentig war.

Die alkoholische Mutterlauge des Salzes, die noch viel verseiftes Chlorophyllin enthielt, ließ sich durch Verarbeitung auf

[1]) Ann. d. Chem. 358, 215 [1907].

gewisse ätherlösliche Chlorophyllinsalze[1]) verwerten. Das Natrium-, Calcium- und Magnesiumsalz sind bei Gegenwart der vielen Begleitstoffe der Mutterlauge in Äther leicht löslich.

Die Mutterlauge wird in Portionen von 15—20 l in Glasballons mit dem anderthalbfachen Volumen Wasser verdünnt und das Calciumsalz durch Zufügen der Lösung von 1 kg Chlorcalcium ausgefällt. Dabei schüttelt man recht heftig; die ausgeschiedenen Flocken ballen sich dann meistens vollständig zu einer halbfesten zähen Masse zusammen, die an der Gefäßwand festklebt. Noch leichter wird dies erreicht, indem man beim Verdünnen der Chlorophyllinlösung lauwarmes Wasser anwendet. Nach dem Abheben der Lauge wird das Calciumsalz mit 2—3 l Äther aus dem Ballon herausgelöst; die Ätherlösung wäscht man einige Male mit Wasser und trocknet sie mit Natriumsulfat. Man kann nun das Salz entweder mit Petroläther ausfällen oder nach starkem Einengen der ätherischen Lösung mit Alkohol abscheiden, der dann beim Eindampfen noch eine sehr unreine Mutterlaugenportion liefert.

Die Mutterlauge von (189 g) Chlorophyllinkalium aus 66 kg Brennesseln gab 620 g Chlorophyllincalcium, mit Alkohol aus der ätherischen Lösung gefällt; es war farbäquivalent 97 g krystallisiertem Chlorophyll.

Neue Verfahren[2]).

Die Anwendung von gereinigtem Chlorophyll, auch in der leicht zugänglichen Form unseres sogenannten Rohchlorophylls oder der Rohchlorophylltalkmischung anstatt der Extrakte bietet den Vorteil, daß der Reinheitsgrad des Chlorophyllinsalzes viel höher wird.

Noch wichtiger ist eine zweite Abänderung. Die Verseifung geht bei der Behandlung einer alkoholischen Lösung mit Alkali bei gewöhnlicher Temperatur stets nach den beiden möglichen Richtungen, der Bildung von Chlorophyllin- und von Isochlorophyllinsalz. Deshalb allomerisieren wir zuerst das Chlorophyll. Dann liefert die Komponente a unter keiner Bedingung mehr

[1]) Ann. d. Chem. 358, 218 [1907].
[2]) Unveröffentlicht.

Isoverbindung. Für b gilt nicht das gleiche. Auch nach der Allomerisation gibt die Komponente b noch die verschiedenen möglichen Chlorophyllinsalze bei der Hydrolyse in kalter Lösung und sogar noch einen großen Anteil des dem Phytorhodin g entsprechenden Isochlorophyllinsalzes bei der Verseifung in der Wärme. Führt man aber das allomerisierte Chlorophyll in ätherische Lösung über und läßt man hierauf methylalkoholisches Kali einwirken, so entstehen die Chlorophyllinsalze frei von Isokaliumverbindungen, also nur die Magnesiumverbindungen der schwach basischen Phytorhodine k und i (neben derjenigen von Phytochlorin g). Durch die glatte Bildung dieser Chlorophylline wird auch die Ausbeute an den Kaliumsalzen a und b erhöht, weil dieselben schwerer löslich sind als die entsprechenden Isokaliumsalze.

Chlorophyllinkalium, aus allomerisiertem Chlorophyll durch Verseifung mittels der ätherischen Lösung gewonnen, bildet das geeignetste Ausgangsmaterial für Pyrrophyllin.

5 kg Brennesselmehl wurden mit Schichtdicke von 3 cm auf 2 Steinzeugnutschen mit 15 l 80proz. Aceton extrahiert, wie im Kap. III, Abschn. 2, beschrieben. Der Extrakt (9,1 l) enthielt in einem Beispiel 41 g Chlorophyll; er wurde mit 200 g Talk und unter Umschütteln mit 4 l Wasser versetzt, so daß die Flüssigkeit nur noch aus 55 prozentigem Aceton bestand und bei kurzem Stehen fast allen grünen und gelben Farbstoff ausschied. Man hat auf einer Nutsche durch etwas Talk von der schwach gelbgrünen Mutterlauge filtriert, mit einem Liter 65 prozentigem Aceton und darnach mit einem Liter 65 prozentigem Alkohol gewaschen und so scharf wie möglich abgesaugt.

Der fast trockene grünschwarze Talk wird nun in einer Pulverflasche durch Schütteln mit 3 l 95 prozentigem Alkohol extrahiert und mit ebensoviel auf der Nutsche nachgewaschen. Bei Anwendung von absolutem Alkohol sind 3—4 l zum Extrahieren und Nachwaschen hinreichend. Im Talk blieb etwas Xanthophyll und Carotin zurück.

Die schöne alkoholische Chlorophyllösung versetzen wir, um nur die Allomerisation, aber noch keine Verseifung zu bewirken,

unter Umschütteln mit 5 ccm konzentrierter methylalkoholischer Kalilauge und lassen sie stehen. Nach 16 Stunden gibt die Phasenprobe nur noch eine undeutliche, olivgrüne Farbe und nach 2 bis 3 Tagen ist das Chlorophyll quantitativ allomerisiert, viel rascher in absolutem Alkohol.

Nun wird der Farbstoff aus dem Alkohol in Äther übergeführt durch portionenweises Eingießen und vorsichtiges Verdünnen mit Wasser. Nach dem Herauswaschen des Alkohols beträgt das Volumen des Äthers 3—4 l. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat schütteln wir die ätherische Lösung in einer großen Pulverflasche mit 100 ccm konzentrierter methylalkoholischer Lauge kräftig durch. Das Chlorophyllinsalz scheidet sich nach einiger Zeit zähflüssig an den Wänden und am Boden aus. Wenn die ätherische Lösung sich ziemlich geklärt hat und eine Probe beim Schütteln mit Wasser rein gelb wird und nicht mehr fluoresciert, dann dekantieren wir die Mutterlauge, welche ein gutes Ausgangsmaterial für Carotin und Xanthophyll bildet, waschen unter Umschwenken zweimal mit Äther nach und schütteln die grüne Masse mit 1 l absolutem Alkohol an. Sie wird dabei feinkörnig krystallinisch; so daß man sie von dem verhältnismäßig farbstoffarmen Alkohol leicht filtrieren und mit absolutem Alkohol nachwaschen kann.

Die Ausbeute an exsiccatortrockenem Chlorophyllinkalium beträgt 33—37 g; d. i. 29,8—33,4 g hochvakuumtrocken, also 6,0 bis 6,7 g aus 1 kg trockener Blätter. Der Reinheitsgrad des Salzes ist 88, d. h. es enthält 12% farblose Beimischung. Das prachtvoll stahlblauglänzende Präparat löst sich mit brillantgrüner Farbe in Wasser und zwar ohne Fluorescenz. Es ist frei von gelben Pigmenten; beim Ansäuern liefert es nur schwach basische Spaltungsprodukte, deren ätherische Lösung 6prozentige Salzsäure nicht anfärbt.

Rohes Chlorophyllinkalium a. Ohne Allomerisation gewinnen wir aus der alkoholischen Chlorophyllösung, die aus der Rohchlorophylltalkmischung extrahiert wird, direkt Chlorophyllinkalium durch Verseifung in nicht zu verdünnter Lösung. Unter diesen Bedingungen führt die Hydrolyse der Kompenente b großenteils zur Isoverbindung, welche leichter löslich ist und in

der Mutterlauge bleibt. So erhält man einfach Präparate von Chlorophyllinkalium, welche etwa $^9/_{10}$ von der Komponente a enthalten. Chlorophyllin b läßt sich darin beim Fraktionieren der Spaltungsprodukte mit 17 prozentiger Salzsäure noch nachweisen. Ein solches Chlorophyllinpräparat ist von Wert für die Gewinnung von Rhodophyllin.

Das auf Talk ausgefällte Rohchlorophyll bringen wir mit möglichst wenig absolutem Alkohol durch Anschütteln in der Flasche in Lösung und verseifen diese mit viel konzentrierter methylalkoholischer Lauge, z. B. mit 50 ccm für den Farbstoff aus einem kg Blattmehl. Das Chlorophyllinsalz beginnt schnell auszufallen; beim Stehen während eines halben Tages bildet es ein blauschwarzes, körnig krystallines Pulver; es wird mit absolutem Alkohol nachgewaschen.

Die Ausbeute beträgt 4—5 g (für 1 kg Blattmehl) Chlorophyllinsalz, das 85—90% reiner Kaliumverbindung enthält.

Reines Chlorophyllinkalium a[1]). In krystallisiertem Zustand gewannen wir das Salz aus petrolätherischen Lösungen von Chlorophyll a, welche die Fraktionierung des Komponentengemisches geliefert hatten. Die petrolätherische Lösung von 3 g Substanz schüttelten wir mit 10 ccm 7 prozentiger methylalkoholischer Kalilauge durch. Das Chlorophyll ging mit brauner Farbe in die Lauge, dann kehrte in einigen Minuten die chlorophyllgrüne Farbe zurück und die Kaliumverbindung krystallisierte reichlich in schönen dunkelblau glänzenden Blättchen aus, die in der Durchsicht unter dem Mikroskop rein grüne Farbe zeigten. Der Petroläther wurde abgegossen und das Salz mit möglichst wenig Holzgeist herausgespült und auf dem Filter mit absolutem Alkohol nachgewaschen.

Die methylalkoholische Mutterlauge haben wir mit etwas Holzgeist verdünnt und mit Kohlensäure gesättigt. Dabei schied sich zusammen mit methylkohlensaurem Kalium fast der ganze Rest des Kaliumsalzes aus und ließ sich durch fraktionierte Krystallisation aus Holzgeist ziemlich rein erhalten.

---

[1]) Ann. d. Chem. 382, 157 [1911].

Die erste Krystallisation von Kaliumsalz war frei von Pottasche. Das schöne Präparat ist umgeschieden worden durch Aufnehmen bei gewöhnlicher Temperatur mit 100 ccm absolutem Holzgeist, wobei etwas Farbloses zurückblieb, starkes Einengen im Vakuum und Ausfällen mit absolutem Alkohol. Die Ausbeute betrug dann 0,8 g.

Das Chlorophyllinsalz ist in Wasser mit prächtig blaugrüner Farbe sehr leicht, in kaltem Holzgeist ziemlich leicht, in warmem leicht löslich, in Äthylalkohol kalt schwer, heiß nur wenig leichter, in Pyridin sehr schwer löslich. Das Präparat wird nicht ganz frei von Methoxyl und entspricht daher nur annähernd der Formel $[C_{31}H_{31}N_4Mg](COOK)_2$ oder $[C_{31}H_{29}N_4Mg](COK)(CO_2K)_2$.

Bei vorsichtigem Ansäuern mit primärem Phosphat wird Chlorophyllin frei, beim Zersetzen mit Salzsäure entsteht das unbeständige olivgrüne Phytochlorin g, das aus Äther erst von 11 prozentiger Salzsäure reichlich aufgenommen wird, und zwar mit blaustichig grüner Farbe.

XIX. Einführung des Magnesiums in die Derivate des Chlorophylls[1]).

Die durch Austritt von Magnesium gebildeten Chlorophyllderivate, z. B. Phäophorbid, Phytochlorin, Phytorhodin und die verschiedenen Porphyrine, lassen sich leicht von Metall substituieren unter Bildung komplexer Verbindungen, die sich durch ihre Beständigkeit in sauren und alkalischen Medien auszeichnen. Solche Metallverbindungen entstehen z. B. bei der Einwirkung von Kupfer-, Zink- und Eisensalzen in Eisessig, oft auch in alkoholischer Lösung auf die stickstoffhaltigen Carbonsäuren und ihre Ester. Mit der Bildung der komplexen Verbindungen gehen bedeutende Veränderungen in der Farbe und in den basischen Eigenschaften Hand in Hand. Die Aufnahme der Metalle wird dadurch so augenfällig, daß man die allergeringsten Spuren gewisser Metalle, wie Zink oder Kupfer, mit Hilfe von Phytochlorin e nachweisen kann. Nur mit besonderer Vorsicht gelingt es, die magnesiumfreien Chlorophyllderivate ganz aschefrei zu erhalten[2]). Der Zinkgehalt der Gläser ist störend, der Kupfergehalt von Lösungsmitteln verrät sich.

Um Kupfer z. B. im reinen Methylalkohol des Handels nachzuweisen, lösen wir darin Phytochlorin e und lassen einige Zeit stehen. Die Reaktion erfolgt rascher bei Gegenwart von Pyridin.

---

[1]) Abh. XXI.

[2]) Spatel von unedlem Metall dürfen beim Arbeiten mit den Chlorophyllderivaten nicht angewandt werden. Wir verwenden zumeist Spatel von Feinsilber und für gewisse Zwecke dünne Spatel aus einer elastischen federnden Legierung von Gold-Platin (90% Gold) mit Holzgriff, die wir von W. C. Heraeus anfertigen ließen.

Man führt dann das Chlorophyllderivat wieder in Äther über und entfernt durch Waschen mit 10 prozentiger Salzsäure quantitativ das überschüssige Phytochlorin. In Äther bleibt die gegen Säure beständige, intensiv blaugrüne Kupferverbindung des Phytochlorins e.

Der Nachweis von Zink in zinkhaltigen Gläsern benützt ihre Eigenschaft, an Alkalien sehr leicht das Metall[1]) abzugeben, z. B. schon beim Auflösen von reinem Kaliumhydroxyd in Methylalkohol (50 g KOH in 100 ccm) in den zu prüfenden Gefäßen. Verseift man dann im Reagierrohr aus Silber oder reinem Kaliglas 5 mg Phäophytin mit etwa 5 ccm dieser Lauge in der Hitze oder löst man 3—4 mg Phytochlorin e darin auf, so bleibt die Lösung bei Anwesenheit von Zink auch beim Verdünnen mit Wasser grün und der Farbstoff geht beim Ansäuern mit Mononatriumphosphat mit rein blauer Farbe und intensiver dunkelroter Fluorescenz in Äther über. Mit 5 prozentiger Salzsäure läßt sich daraus überschüssiges Chlorin e entfernen. Die Zinkverbindung wird beim Ausschütteln ihrer ätherischen Lösung von 12 prozentiger Salzsäure langsam, von 20 prozentiger Salzsäure rasch zersetzt. Außer dieser charakteristischen Eigenschaft dient zur Identifizierung der komplexen Verbindung ihr Spektrum, das dem Chlorophyllspektrum ähnlich und von dem der metallfreien Derivate ganz verschieden ist. Die Hauptbänder sind bei $\mu\mu$ 653—623, 603...589, 560.542 und 523..507. Viele Apparate- und Flaschengläser des Laboratoriums erweisen sich bei dieser Prüfung als zinkhaltig.

Die komplexen Verbindungen mancher Metalle sind gegen Säure unbeständig und erfordern andere Bedingungen für ihre Bildung. Phytochlorin liefert mit überschüssigem wasserfreiem Bariumhydroxyd in methylalkoholischer Lösung die intensiv blaugrüne Lösung einer Bariumverbindung, und sogar die Alkalien sind zur Bildung analoger Verbindungen fähig. Diese entstehen beim Auflösen von Phytochlorin und Phytorhodin in konzentriertester alkoholischer Kalilauge und werden schon beim Verdünnen mit Alkohol wieder gespalten. Bei den komplexen Metallverbindungen dieser Gruppe ist also jeder Grad von Beständigkeit

[1]) Über die ersten derartigen Beobachtungen siehe Ann. d. Chem. 358, 249 [1908].

verwirklicht. Zwischen den Extremen, den höchst unbeständigen Kalium- und den beispiellos beständigen Kupferverbindungen, steht der Magnesiumkomplex des natürlichen Farbstoffs.

Es ist nun vor kurzem Willstätter und Forsén gelungen, auch das Magnesium in die metallfreien Chlorophyllderivate einzuführen und dadurch einen kleinen Schritt der Chlorophyllsynthese zu verwirklichen.

Ein brauchbares Reagens hierfür ist Magnesiumoxyd bei Gegenwart sehr konzentrierter Alkalien. In geschmolzenem Kaliumhydroxyd löst sich Magnesium unter Wasserstoffentwicklung klar auf (z. B. 0,1 g Metall in 25 g KOH); bei weiterem Auflösen des Metalls trübt sich die Schmelze. Auch Magnesiumoxyd löst sich, zwar nur spurenweise, in methylalkoholischer Kalilauge, aber beträchtlich in geschmolzenem Ätzkali (z. B. 0,16 g MgO in 25 g KOH). Die Schmelze enthält vielleicht eine Verbindung der Magnesia mit dem Ätzkali, die man als Magnesiat bezeichnen kann: $Mg(OK)_2$.

Wenn man Phäophytin oder ein anderes metallfreies Chlorophyllderivat im silbernen Reagierrohr mit methylalkoholischem Kali und Magnesiumoxyd erhitzt, so entsteht eine Reihe der verschiedenen Phylline, die bei vorsichtigem Ansäuern mit grüner und mit leuchtend blauer und roter Farbe und intensiver Fluorescenz in Äther gehen. So sind aus dem Phytochlorin e zuerst das entsprechende Chlorophyllin und dann drei verschiedene Phylline in größerem Maßstab gewonnen worden, je nachdem die Reaktionstemperatur 180, 200 oder 220° betrug, nämlich die Dicarbonsäuren Cyanophyllin und Erythrophyllin und endlich die Monocarbonsäure Phyllophyllin. In der b-Reihe entstand analog Rubiphyllin aus Phytorhodin g und aus Phytorhodin k Pyrrophyllin.

Es gelingt auch, die Methode zur Einführung von Magnesium auf die Porphyrine aus Hämin zu übertragen und ferner sie für die Bildung anderer komplexer Metallverbindungen zu erweitern, z. B. Eisen in die Porphyrine einzuführen durch Erhitzen mit methylalkoholischem Kali und Eisenoxyd.

Die Methode hat einen Übelstand. Durch die Anwendung starker Alkalien und hoher Temperatur wird die Bildung des

Chlorophylls selbst und die seiner ersten Umwandlungsprodukte aus den magnesiumfreien Derivaten ausgeschlossen. Hier führt eine zweite Methode für die Einführung des Magnesiums zum Ziel, die auf der Reaktion der Chlorophyllderivate mit Grignardscher Lösung beruht.

Man kann Amino- und Iminogruppen bekanntlich quantitativ mit Hilfe der Magnesiumalkylhalogenide substituieren. Mit Phäophytin, z. B. mit der reinen Komponente a desselben, reagiert Methylmagnesiumjodid unter Bildung unlöslicher Magnesiumjodverbindungen. Bei der Einwirkung von 1 Mol. $MgCH_3J$ entsteht eine Fällung, welche 2 At. Magnesium enthält, bei Anwendung der doppelten Menge Grignardscher Lösung ein Salz mit 4 At. Magnesium. Die beiden so erhaltenen Niederschläge gaben unter allen Umständen bei der Zersetzung mit Wasser, Säuren, Salzlösungen und anderen Reagenzien nur Phäophytin zurück. Ganz anders war das Resultat bei Anwendung einer noch größeren Menge Magnesiummethyljodid (z. B. 8 Mole). Dadurch wird das Phäophytin quantitativ in Form einer Verbindung niedergeschlagen, die bei Zersetzung mit Wasser und Äther eine chlorophyllgrüne, also magnesiumhaltige Lösung liefert. Führt man den nämlichen Versuch mit Chlorophyll selbst aus, so entsteht gleichfalls eine magnesium- und jodreiche Fällung, die bei der Zersetzung ein hinsichtlich des Magnesiumgehaltes und der Phytol-, sowie Methoxylzahl unverändertes Chlorophyllpräparat liefert.

Die verschiedenen Estergruppen bleiben also fürs erste intakt bei der Behandlung mit Methylmagnesiumjodid.

Dennoch war das Resultat noch nicht brauchbar. Die so gebildeten Magnesiumverbindungen waren kein ganz unversehrtes Chlorophyll; sie gaben nämlich die „braune Phase" des Chlorophylls bei Einwirkung von Kalilauge nicht, sie waren also unter der Wirkung der bei der Hydrolyse auftretenden basischen Magnesiumverbindung allomerisiert. Erst als Willstätter und Forsén die Zersetzung der mit Grignardscher Lösung gewonnenen Fällung mit überschüssigem Mononatriumphosphat in rascher Operation vornahmen, gelang es, die Phäophytinkomponente a in die reine Chlorophyllkomponente a überzuführen.

Auf gleichem Wege können alle möglichen Porphyrine in die entsprechenden Phylline umgewandelt werden.

Eine merkwürdige Umwandlung erfährt das Phäophytin b bei der Einwirkung von Grignardscher Lösung, nämlich vor der Bildung des Magnesiumkomplexes einen Übergang in die Reihe der Komponente a, allerdings nicht durch eine einfache Reduktion zur sauerstoffärmeren Komponente selbst, sondern vermutlich durch Addition des Magnesiumalkylhalogenides an eine Carbonylgruppe.

1. Einführung von Magnesium mit Magnesiumoxyd und Ätzkali.

Bildung von Cyanophyllin. Einheitliches Cyanophyllinkalium entstand aus Phytochlorin e bei vierstündigem Erhitzen mit methylalkoholischem Kali und Magnesiumoxyd auf 180°. Wir haben die violette Modifikation des Chlorins (Lactamhydrat) verarbeitet und in Mengen von 1 g mit dem gleichen Gewicht Magnesia und 10 ccm konzentrierter methylalkoholischer Lauge im Autoklaven mit Silbereinsatz erhitzt. Dann fällten wir das Kaliumsalz der gebildeten Magnesiumverbindung durch Zusatz von 50 ccm Wasser und etwas Kochsalzlösung vollständig aus. Das rohe Cyanophyllinkalium, dem noch Magnesia beigemischt war, wurde mit 1 l Wasser aufgenommen und im Scheidetrichter mit 3 l Äther ausgeschüttelt, um es vorsichtig mit primärem Natriumphosphat anzusäuern. In Freiheit gesetzt, ging das Phyllin mit rein blauer Farbe und sehr starker, leuchtend roter Fluorescenz in den Äther. Die Lösung haben wir mit viel Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und auf 10 ccm eingeengt. Dann war es notwendig, nochmals zu filtrieren, da das Cyanophyllin sich ähnlich zersetzt wie Phyllophyllin, sogar noch leichter als dieses, indem es sich in Magnesiumsalz, hauptsächlich vom entsprechenden Porphyrin, verwandelt. Schon beim Stehen in der Kälte wird die ätherische Lösung allmählich trübe und grau. Die Ausbeute an dem freien Phyllin leidet dadurch, wir erhielten nur 0,4 g, obwohl das Kaliumsalz so gut wie quantitativ gebildet war.

Die konzentrierte ätherische Cyanophyllinlösung gab mit Petroläther einen grünblauen flockigen Niederschlag, dessen Analyse das Atomverhältnis N_4: 0,95 Mg ergab.

Phyllophyllin aus Phytochlorin e. Wird beim Erhitzen mit Magnesiumoxyd und methylalkoholischer Kalilauge die Temperatur 6 Stunden lang auf 220° gehalten, so entsteht unter Abspaltung von Kohlensäure die leicht zersetzliche Monocarbonsäure, die früher nur in Form ihrer Salze analysiert worden war. Nach dem Erhitzen von 1 g Phytochlorin mit 15 ccm der Lauge und 1 g MgO ist das gebildete Kaliumsalz mit 50 ccm Wasser vollständig ausgefällt worden. Durch Verreiben mit Wasser und Äther wurde es in Lösung gebracht und mit Phosphat vorsichtig angesäuert. Die ätherische Lösung enthielt eine Beimischung von zweicarboxyligem Phyllin, das sich durch viermaliges Anschütteln mit sehr viel 0,025prozentigem Ammoniak beseitigen ließ. Dann wurde der Äther wieder mit primärem Phosphat durchgeschüttelt, gewaschen und getrocknet. Es gelang aus der bis auf etwa 15 ccm eingeengten, nochmals filtrierten Lösung durch Zusatz von Petroläther (400 ccm) das reine Phyllophyllin (0,5 g) auszufällen, das durch die Analyse und die eigentümlichen Löslichkeitsverhältnisse des Calciumsalzes identifiziert wurde.

2. Einführung von Magnesium mit Hilfe Grignardscher Verbindungen.

Reaktion von Phäophytin mit Methylmagnesiumjodid. Die für die folgenden Versuche dienende Grignardsche Lösung erforderte zur Neutralisation eines Kubikzentimeters 11,94 ccm n/10—H_2SO_4, entsprechend 0,198 g $MgJCH_3$, d. i. 1 Mol. für 1 g Phäophytin a.

Diese Menge der Magnesiumlösung gab mit der Ätherlösung (700 ccm) von 1 g Phäophytinkomponente a eine unvollständige Fällung, dunkle Flocken, die nach der Isolierung unter vollkommenem Feuchtigkeitsausschuß in dem Apparate von E. Beckmann und Th. Paul[1]) und nach dem Trocknen ein in allen Sol-

[1]) Ann. d. Chem. 266, 1 [1891].

venzien unlösliches blauschwarzes Pulver bildeten (0,6 g). Es blieb also viel Phäophytin in der Mutterlauge.

Das exsiccatortrockene Präparat enthielt 4,46% N, 3,85 Mg und 18,0 J, entsprechend dem Atomverhältnis:

$$N_4: 2{,}0\ Mg: 1{,}8\ J.$$

Diese Magnesiumverbindung ließ bei der Zersetzung mit allen möglichen Reagenzien kein Chlorophyll entstehen, sondern bildete nur Phäophytin zurück.

Auch die doppelte Menge von Methylmagnesiumjodid (2 ccm für 1 g Phäophytin a in 700 ccm Äther) reichte nicht hin, um das Phäophytin vollständig auszufällen; sie gab einen viel magnesiumreicheren Niederschlag, der auch in den üblichen Lösungsmitteln unlöslich war und aus welchem gleichfalls mit Wasser oder verdünnter Phosphorsäure hauptsächlich Phäophytin regeneriert wurde.

Dieses zweite Präparat enthielt 3,92 bzw. 3,97% N, 6,88 Mg, 31,4 J und ergab das Verhältnis:

$$N_4: 4{,}0\ Mg: 3{,}5\ J.$$

Als wir die Menge der Grignardschen Lösung nochmals verdoppelten, also 4 Mole Methylmagnesiumjodid einwirken ließen, war die Fällung des Phäophytins ziemlich vollständig und der Niederschlag zeigte ein ganz anderes Verhalten gegen Wasser und Säure: ein Atom Magnesium blieb bei der Hydrolyse im Molekül.

Aus den Vorarbeiten für diese Methode der Einführung des Metalls verdient noch Erwähnung, daß reines Chlorophyll beim Fällen mit überschüssigem Methylmagnesiumjodid (etwa 8 Molen) und Zersetzen des Niederschlages mit Mononatriumphosphat unversehrt zurückgewonnen werden konnte. Weder im Magnesium noch im Phytolgehalt oder an der Gruppe $COOCH_3$ war eine Veränderung erfolgt. Die Analyse von solchem wiedergewonnenem Chlorophyll ergab nämlich das Verhältnis:

$$N_4: 1{,}02\ Mg: 0{,}93\ Phytol: 0{,}98\ OCH_3.$$

Umwandlung von Phäophytin a in Chlorophyll a.

Das Ausgangsmaterial für diesen Versuch war ein Präparat der Phäophytinkomponente a, das bei der Hydrolyse glatt Phyto-

chlorin e lieferte. Die ätherische Lösung dieses Phäophytins (1 g in 1 l) haben wir mit der Grignardschen Lösung tropfenweise versetzt, bis eine Probe im Reagierglas beim Durchschütteln mit verdünnter Phosphorsäure eine nicht mehr olivstichige, sondern rein blaue Lösung lieferte. Dann war auch die gesamte Menge in hellgrünen Flocken niedergeschlagen. Die Zersetzung des viel Jod und Magnesium enthaltenden Zwischenproduktes gibt ein schönes Resultat, wenn man sie rasch, mit viel überschüssigem primärem Phosphat ausführt, indem man z. B. 1 l 10prozentiger Mononatriumphosphatlösung auf einmal hinzufügt und sofort kräftig durchschüttelt. Die ätherische Lösung zeigt nun die prachtvoll blaue Farbe der Chlorophyllkomponente a. Nach gründlichem Waschen mit sehr viel Wasser und Trocknen der Lösung wurde das gebildete Chlorophyll mit Petroläther ausgefällt (0,8 g).

Bei unmittelbarem Vergleich stimmte es genau mit der reinen Chlorophyllkomponente a überein, nämlich in der Zusammensetzung, den Farberscheinungen der Lösungen, der Phasen- und Spaltungsprobe.

Phyllophyllinmethylester aus dem Porphyrinester.

Die Bildung dieses Esters sei angeführt als Beispiel für die bei allen Porphyrinen anwendbare Einführung des Magnesiums in die komplexe Bindung mit Hilfe der Grignardschen Lösung.

Der Phylloporphyrinmethylester wurde in siedendem absolutem Äther gelöst (0,7 g in 1 l) und nach dem Erkalten Tropfen für Tropfen mit Methylmagnesiumjodid gefällt, bis eben eine kleine Probe nach vorsichtiger Zersetzung mit primärem Phosphat keine Spur Phyllophorphyrinester mehr zurückbildete, nämlich nichts mehr aus ätherischer Lösung an 2prozentige Salzsäure abgab.

Die Sustanz war quantitativ in himbeerroten Flocken gefällt; es war nicht nötig, diese zu isolieren, sondern wir schüttelten einfach die Suspension in Äther mit überschüssigem Mononatriumphosphat durch und engten dann die blaustichig rote, fluorescierende Lösung nach dem üblichen Waschen und Trocknen sehr

weit ein. Erst als das Lösungsmittel bis auf ein paar Kubikzentimeter abdestilliert worden war, krystallisierte der Methylester des Phyllophyllins in rhombenförmigen Blättchen, deren stumpfe Winkel oft abgerundet waren. Einmal auskrystallisiert, war die Substanz nur recht wenig löslich in Äther; sie ließ sich aus Alkohol schön umkrystallisieren.

Einwirkung Grignardscher Lösung auf die Verbindungen der b-Reihe[1]). Phäophytin b wird analog wie die a-Komponente mit 4 Molen Grignardscher Verbindung ($MgCH_3J$) vollständig ausgefällt als Additionsprodukt in braunroten Flokken, die aber, anders als bei a, selbst beim Kochen mit der doppelten Menge Magnesiumlösung nicht grün werden, also nicht in die komplexe Magnesiumverbindung übergehen. Beim Schütteln der Suspension mit Mononatriumphosphatlösung färbt sich der Äther mit der braunroten Farbe des unveränderten Phäophytins b.

Bei der Einwirkung eines großen Überschusses von Methylmagnesiumjodid (0,4 g $MgCH_3J$ in 25 ccm Äther) auf eine ätherische Lösung von Phäophytin b (0,025 g in 25 ccm) fällt das Reaktionsprodukt augenblicklich in braunen Flocken aus, die sehr rasch gelb werden. Bei sofortigem Ansäuern entsteht eine olivbraune ätherische Lösung, die sehr an Phäophytin a erinnert, und die heiße Verseifung einer eingedampften Probe mit methylalkoholischem Kali liefert zu vier Fünftel ein Spaltungsprodukt, das wie Chlorin e aussieht, in Äther olivgrün und in 3prozentiger Salzsäure grünstichig blau.

Ein direkter Vergleich mit reinem Phytochlorin e läßt aber deutliche Unterschiede erkennen. Das aus Phäophytin mit Methylmagnesiumjodid gewonnene Spaltungsprodukt ist etwas stärker basisch (Salzsäurezahl 2—$2^1/_2$); es ist in Salzsäure blauer und in ätherischer Lösung etwas mehr gelbstichig.

Erst bei längerem Stehen, rascher beim Erwärmen des gefällten Reaktionsproduktes mit Grignardscher Lösung färben sich die anfangs gelben Flocken oliv und schließlich bläulichgrün

---

[1]) Unveröffentlicht.

und gehen bei vorsichtigem Ansäuern mit prachtvoll blaugrüner Farbe in Äther über. Diese Lösung stimmt in Farbe und Phase mit Chlorophyll a überein, aber die Spaltungsprobe liefert neben etwas Rhodin g dasselbe, von wahrem Phytochlorin e etwas abweichende Spaltungsprodukt wie vor der Einführung des Magnesiums.

Auch Chorophyll b wird durch Grignardsche Lösung gefällt und bei großem Überschuß von Magnesiumlösung in ein Derivat der a-Reihe verwandelt, das beim Abbau zu demselben Spaltungsprodukt führt wie Phäophytin.

Ohne Nebenprodukte, wie sie bei Chlorophyll und Phäophytin durch Verseifung der Estergruppen oder durch Allomerisation entstehen, verläuft die Umwandlung beim Phytorhodin g, das man wegen seiner Schwerlöslichkeit in Äther in trockenem Pyridin löst und mit sehr viel Grignardscher Verbindung behandelt, da Pyridin damit auch reagiert. Wir gaben 0,02 g Rhodin g in 1 ccm Pyridin zu 100 ccm einer $1^1/_2$prozentigen Methylmagnesiumjodidlösung. Das Rhodin wurde in grünen Flocken zusammen mit dem Additionsprodukt des Pyridins gefällt und lieferte beim Ansäuern vollständig das Chlorin mit der Basizität 2—$2^1/_2$.

Die reaktionsfähige sauerstoffhaltige Gruppe ist demnach sowohl dem Chlorophyll selbst, wie dem durch Umlactamisierung entstandenen Phytorhodin g eigen. Es ist die Gruppe, die den entsprechenden Verbindungen der a-Reihe fehlt; aus diesen geht nämlich auch nach der Einwirkung eines großen Überschusses von Grignardscher Lösung wahres Phytochlorin e hervor.

Homologe Grignardsche Verbindungen führen zu verschiedenen Endprodukten; die Basizität und Farbe des Reaktionsproduktes wechselt mit dem Alkyl der Grignardschen Verbindung, die sich an ein Carbonyl anlagert.

Magnesiumbrombenzol gibt z. B. unter den beschriebenen Bedingungen mit Phytorhodin g ein ätherlösliches Additionsprodukt und beim Ansäuern einen in Äther gelblich-oliven Farbstoff, der erst in 5—6prozentige Salzsäure reichlich mit blaugrüner Farbe übergeht.

Nach P. Jolibois[1]) dargestelltes Magnesiumhydrür (wahrscheinlich MgHJ-haltig) liefert mit Phytorhodin g in Pyridin beim Kochen und Ansäuern ein sehr stark basisches Produkt, das aus Äther, worin es sich sehr schwer mit gelblich-oliver Farbe löst, schon von $^1/_2$prozentiger Salzsäure zu zwei Dritteln extrahiert wird.

[1]) C. r. 155, 213 [1912] und 155, 353 [1912].

XX. Abbau von Chlorophyll durch Alkalien: Phylline und Porphyrine.

1. Übersicht.

Der Magnesiumkomplex des Chlorophylls bleibt beim Erhitzen mit Alkalien erhalten. Dabei entsteht eine Reihe magnesiumhaltiger Carbonsäuren von prächtig blauer und roter Farbe, die Phylline. In ihnen ist die komplexe Bindung des Magnesiums Säuren gegenüber sehr reaktionsfähig. Unter Austritt des Metalls, womit eine erhebliche Farbänderung einhergeht, entsteht aus den Phyllinen eine analoge zweite Reihe von sauren Verbindungen, die wegen einer gewissen Ähnlichkeit mit den eisenfreien Derivaten des Hämins als Porphyrine bezeichnet worden sind.

Willstätter und Pfannenstiel[1]) und Fritzsche[2]) haben den Abbau des Chlorophylls beim Erhitzen mit methylalkoholischem Kali untersucht und als Endprodukte zwei isomere Monocarbonsäuren von der Formel $[MgN_4C_{31}H_{33}](COOH)$ aufgefunden, Phyllophyllin[3]) und Pyrrophyllin. Diese lassen sich nicht ineinander überführen; sie liefern aber, wie im XXIII. Kapitel mitgeteilt wird, durch Abspaltung von Kohlensäure die beiden Stammsubstanzen der Gruppe:

Ätiophyllin $MgN_4C_{31}H_{34}$
Ätioporphyrin $N_4C_{31}H_{36}$.

---

[1]) Abh. V.
[2]) Abh. VIII.
[3]) Zu dieser eigentümlichen Bezeichnung waren wir dadurch genötigt, daß dieses Phyllin dem zuvor bekannten Phylloporphyrin entsprach. Die Namen Glauko- und Cyanophyllin sind von den griechischen Ausdrücken für blau, die Vorsilben der Namen Rhodo-, Erythro-, Rubi-, Pyrrophyllin von Bezeichnungen für rot abgeleitet.

Nun entsteht nicht etwa Pyrrophyllin aus der einen, Phyllophyllin aus der andern Chlorophyllkomponente, sondern aus jeder Chlorophyllkomponente beide, je nach den Bedingungen des Abbaus.

Die Erklärung dafür bietet die Lactamtheorie der braunen Phase (siehe Kap. I) mit der Annahme, daß bei der Verseifung beispielsweise der Chlorophyllkomponente a zum

Chlorophyllin die Lactamgruppe $\begin{matrix} CO\gamma \\ | \\ NH\delta \end{matrix}$ geschlossen,

die Carboxyle α und β frei, zum

Isochlorophyllin die Lactamgruppe $\begin{matrix} CO\alpha \\ | \\ NH\gamma \end{matrix}$ geschlossen,

die Carboxyle γ und β frei werden.

Diese Lactamgruppen verschwinden bei dem Abbau zu den blauen Zwischenprodukten und weiterhin wird das Carboxyl β verloren.

Der Unterschied der eincarboxyligen Phylline liegt also wahrscheinlich in der Verschiedenheit, d. h. im verschiedenen Ort der Carboxyle α und γ.

Die beiden Isomeren, Phyllo- und Pyrroporphyrin stimmen nicht nur in der Zusammensetzung überein, neben einigen in der folgenden Tabelle zusammengestellten charakteristischen Unterschieden, welche eine eindeutige Beschreibung möglich machen,

	Pyrroporphyrin	Phylloporphyrin
Salzsäurezahl	1 1/2	1/2—3/4
Löslichkeit des Chlorhydrates in Salzsäure mittlerer Verdünnung	schwer löslich	leicht löslich
Farbe einer konzentr. Lösung in verdünnter Salzsäure	blaurot, blau tingierend	braunstichig rot, grünlich tingierend
Ausfärbung auf Seide	kupfrig rot	dichroitisch, grünlich, bronzebraun u. kupfrig
In Eisessig	kalt ziemlich schwer löslich.	sehr leicht löslich.

zeigen sie auch so viele gemeinsame Merkmale, daß es schwer zu entscheiden war, ob die eine oder die andere dem Phylloporphyrin der Literatur entspricht.

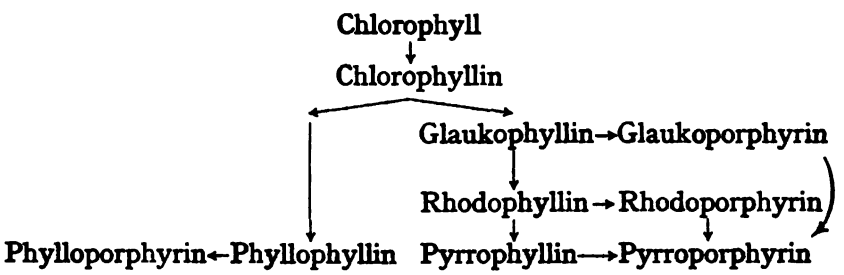
In einer Untersuchung über die Einwirkung von Alkali auf Chlorophyllan bei hoher Temperatur ist F. Hoppe-Seyler[1]) einer Verbindung begegnet, die seinem Hämatoporphyrin optisch sehr ähnlich war. Er hat den Namen Phylloporphyrin eingeführt. E. Schunck[2]) hat zehn Jahre nachher und später gemeinsam mit L. Marchlewski[3]) beim Erhitzen von Chlorophyllderivaten mit Alkali ein Abbauprodukt reiner dargestellt und darauf die Bezeichnung von Hoppe-Seyler übertragen. Zum Teil stimmt unser reines Phylloporphyrin mit der Beschreibung der Literatur überein; nach den Angaben von Schunck und Marchlewski ist nämlich das Porphyrin in Mineralsäure und Eisessig sehr leicht löslich und „diese Lösungen geben beim Schütteln mit Äther an letzteren nichts ab, auch nicht in dem Falle, wenn man die Lösung stark mit Wasser verdünnt". Andererseits treffen die Angaben über das Absorptionsspektrum eher für Pyrroporphyrin zu, wenn auch die Beobachtungen, da sie sich nur auf eine einzige unbekannte Konzentration und Schichtdicke beziehen, nicht für eine sichere Identifizierung hinreichen.

Es ist sehr wahrscheinlich, daß zwar das stärker basische von unsern beiden Porphyrinen mit dem Phylloporphyrin der Literatur identisch ist, daß aber die früheren Autoren kein einheitliches Porphyrin in Händen hatten, beruht doch die einzige gute Methode, die isomeren Monocarbonsäuren in präparativem Maßstabe rein darzustellen auf der Trennung der entsprechenden Phylline, die sich in der Löslichkeit und Abscheidung ihres Calcium- und Ammoniumsalzes charakteristisch unterscheiden.

In der Abhandlung von Willstätter und Fritzsche ist für den Abbau des Chlorophylls durch Alkalien folgende Übersicht gegeben worden:

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 4, 193 [1880].
[2]) Proc. Roy. Soc. 50, 302 [1891].
[3]) Ann. d. Chem. 284, 81 [1894] und Proc. Roy. Soc. 57, 314 [1895].



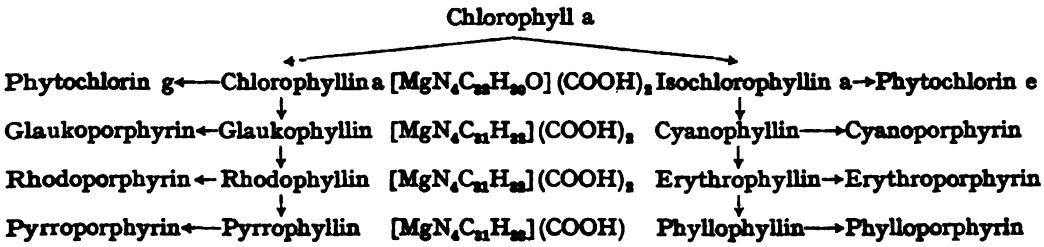
Die Untersuchung von Willstätter und Fritzsche haben wir gemeinsam mit M. Utzinger, L. Forsén und M. Fischer wiederholt nachgeprüft und ihre Angaben bestätigt gefunden; die Lücken in dem obenstehenden Schema sind durch unveröffentlichte Versuche, die wir im folgenden auszugsweise anführen, ausgefüllt worden.

Erst durch Isolierung der reinen Chlorophyllide a und b ist es möglich geworden, die verschiedenen vier Chlorophylline, nämlich

Chlorophyllin, Isochlorophyllin } der Reihe a,
Chlorophyllin, Isochlorophyllin } der Reihe b,

von denen nur das dritte nicht einheitlich, sondern gemeinsam mit dem ersten oder vierten dargestellt worden, als Ausgangsstoffe für die Einwirkung der Alkalien zu verwenden und die wichtigeren Stufen des Abbaus auf den verschiedenen Wegen festzustellen.

Für die Reihe der Chlorophylls a gibt die folgende Tabelle eine Übersicht über den ohne Lücke durchgeführten Abbau zu Di- und Monocarbonsäuren

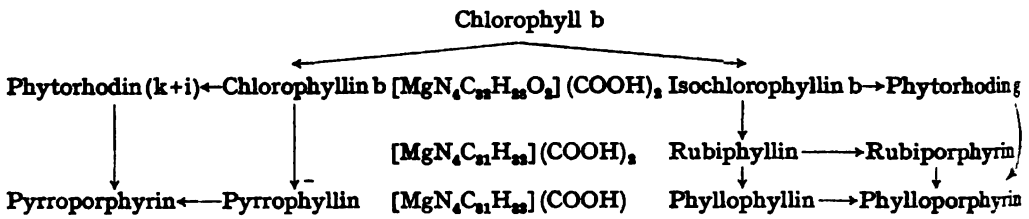


Der Abbau der Chlorophyllinkomponente b zu den Phyllinen war viel schwieriger ausführbar, da in den Verbindungen der

b-Reihe eine weitere sauerstoffhaltige Gruppe vorhanden ist und ohne Abspaltung von Kohlensäure reduziert werden muß. Dies ist durch Erhitzen mit konzentriertem methylalkoholischem Kali unter Zusatz von Pyridin gelungen; auch das gegen Alkali unbeständige Phytorhodin g läßt sich bei Gegenwart von Pyridin zum Phylloporphyrin abbauen.

In der Reihe des Isochlorophyllins b ist vor dem Endprodukt Phyllophyllin eine dem Erythrophyllin entsprechende Zwischenstufe, das Rubiphyllin, rein dargestellt und in seinen Merkmalen mit den Isomeren verglichen worden. Aus Chlorophyllin b ist analog Pyrrophyllin hervorgegangen und zwar, da im Ausgangsmaterial auch Isochlorophyllinkalium b enthalten war, gemeinsam mit Phyllophyllin.

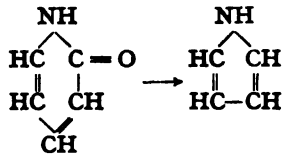
Einige von den Phyllinen hat die Einführung des Magnesiums nach Willstätter und Forsén aus den Phäophorbiden, Phytochlorinen und -rhodinen leichter zugänglich gemacht.



Die sämtlichen Phylline und Porphyrine, welche bei höherer Temperatur aus Chlorophyllinen hervorgehen, sind als Carbonsäuren der Stammsubstanzen Ätiophyllin und -porphyrin definiert. Hinsichtlich ihrer Bildung ist aber noch eine wichtige Frage zu lösen. Chlorophyllin a z. B., bei dem die Verhältnisse etwas einfacher liegen als bei b, verliert beim Abbau zum Glaukophyllin und Rhodophyllin sehr wahrscheinlich ein Kohlenstoffatom, das mit Sauerstoff verbunden ist. Handelt es sich einfach um eine Kohlensäureabspaltung wie bei den späteren Stufen des Abbaus, der Bildung von Pyrrophyllin aus Rhodophyllin, von Ätiophyllin aus Pyrrophyllin? Das ist unwahrscheinlich, weil die Phytochlorine und Phytorhodine erheblich verschieden von allen Porphyrinen sind, die untereinander große Ähnlichkeit aufweisen. Es

ist eher eine tiefergreifende Änderung des Moleküls bei dem Übergang der Chlorophylline in die blauen Verbindungen anzunehmen.

Die Lactamgruppe des Phytochlorins e kann entweder von einem Carboxyl gebildet sein, das einen stickstoffhaltigen Ring substituiert oder von einem Carboxyl, das selbst Bestandteil eines solchen Ringes ist. Nur mit der zweiten Annahme läßt sich der bedeutende Unterschied zwischen Phytochlorin und den Porphyrinen erklären. Bei dem Abbau der Chlorophylline scheint eine Carbonylgruppe ausgeschaltet und ein Pyrrolring neu gebildet zu werden, etwa nach folgendem, nur das Wesentliche des Vorgangs andeutenden Schema:



Es ist noch ungewiß, ob Glauko- und Rhodophyllin ganz gleich zusammengesetzt sind; das erstere, falls nur durch Kohlenoxydaustritt entstehend, kann auch um zwei Wasserstoffatome ärmer sein.

2. Gewinnung der Endprodukte[1]) Pyrro- und Phyllophyllin aus Chlorophyll (a + b).

Die Trennung der einbasischen Pylline von den zweibasischen wird durch die folgenden, sehr charakteristischen Unterschiede ermöglicht:

Pyrro- und Phyllophyllin geben in Alkohol lösliche Kaliumsalze, Rhodo- und Glaukophyllinkalium sind in Alkohol unlöslich.

Aus Äther gehen Pyrro- und Phyllophyllin nicht in verdünntes Ammoniak.

Die einbasischen Phylline lassen sich durch die ungleiche Löslichkeit ihrer Ammonsalze in Äther trennen, namentlich aber auf Grund der Ätherlöslichkeit von Phyllophyllincalcium. Unter den mitgeteilten Versuchsbedingungen entstehen sie übrigens nicht nebeneinander.

[1]) Unveröffentlichte Verfahren.

Die Alkalisalze der Verbindungen mit nur einem Carboxyl werden durch Wasser leicht hydrolytisch gespalten.

Pyrrophyllin aus Chlorophyllin (a + b).

20 g rohes Chlorophyllinsalz enthaltend 16 g reine Kaliumverbindung werden in 400 ccm 35prozentiger methylalkoholischer Lauge (aus mit Alkohol gereinigtem Kaliumhydroxyd) unter Umrühren und Kochen im Silberbecher gelöst und im Autokloven langsam auf 130° erhitzt. Nun halten wir die Temperatur zwei Stunden zwischen 130 und 135° und steigern sie im Laufe einer weiteren Stunde auf 170°. Dann läßt man sie zwei Stunden innerhalb 170—180°, steigert sie im Laufe von $1^1/_2$ Stunden auf 195° und bleibt noch eine Stunde unterhalb 200°. Diese Temperaturen sind in einer silbernen Thermometerhülse bestimmt, welche in die erhitzte Masse hineinragt; es bedingt einen gewissen Unterschied, ob die Temperatur im Innern der Reaktionsflüssigkeit oder im Ölbad des Autoklaven bestimmt wird. Die Art des Erhitzens ist keineswegs gleichgültig, man muß bei den einzelnen Stufen des Abbaus zur Genüge verweilen; namentlich gelingt der Versuch nur dann, wenn die Masse längere Zeit bei der Temperatur von etwa 130° gehalten wird. Das zweicarboxylige Phyllin scheint sich eben durch eine eigentümliche Umformung des Moleküls zu bilden, nicht durch einfache Kohlensäureabspaltung.

Nach dem Erkalten zeigt das Reaktionsprodukt nur sehr schwachen Hämopyrrolgeruch. Auf die Beendigung des Abbaus prüft man nach dem Überführen einer Probe in Äther mit 0,03 prozentigem Ammoniak. Es färbt sich nur schwach an, wenn wenig Dicarbonsäure mehr vorhanden ist. Die ätherische Lösung ist bei guten Versuchen prachtvoll violettrot mit leuchtend gelblichroter Fluorescenz; nach der Zersetzung des Phyllins mit Säure gibt der Äther an 2 prozentige Salzsäure 80—85% des entsprechenden Porphyrins ab.

Den halb erstarrten Autoklaveninhalt verdünnen wir langsam unter Umrühren mit dem doppelten Volumen Wasser und fällen dadurch das Kaliumsalz des Farbstoffs in violetten krystallinischen Flocken fast vollständig aus. Es wird auf der Nutsche abfiltriert und mit wenig Wasser nachgewaschen. Das Salz rührt man mit

100—200 ccm Wasser unter Zusatz von etwas Äther zu einem gleichmäßigen dünnen Brei an, verdünnt ihn mit $^1/_2$ l Alkohol und trägt die feine Suspension in 5 l Äther ein. Sie wird mit 20 g Krystallen von Mononatriumphosphat versetzt und angeschüttelt. Ein großer Teil des Pyrrophyllins geht in den Äther über; die untere Schicht wird mit mehr Wasser verdünnt, in einen zweiten Scheidetrichter abgelassen und mit Äther und noch etwas Phosphat geschüttelt. Die Bildung flockiger Ausscheidung wird dadurch vermieden. Die ätherische Lösung waschen wir mit mäßig verdünntem Mononatriumphosphat und mit Wasser und extrahieren nun das Nebenprodukt Rhodophyllin mit 0,03 prozentigem Ammoniak. Die ersten Auszüge sind prächtig kirschrot, dann färbt sich das Ammoniak nicht mehr an. Es lohnt sich die ammoniakalischen Lösungen auf Rhodophyllin zu verarbeiten; sie werden mit etwas Sprit versetzt, mit Phosphorsäure angesäuert und ausgeäthert. Beim Einengen auf 15 ccm scheidet sich das Rhodophyllin in violett glänzenden Krystallen ab.

Die gereinigte Pyrrophyllinlösung schüttelt man zur Befreiung von Ammoniak mit Phosphorsäure durch und trocknet nach dem Waschen mit geglühtem Natriumsulfat. Dann konzentrieren wir sie sehr schnell im Wasserbad bis auf 1 l, filtrieren und dampfen die Lösung im Vakuum bei gewöhnlicher Temperatur auf 50 ccm ein, worauf sie mit 1 l Petroläther langsam und unter Umrühren gefällt wird. Nach eintägigem Stehen im Eisschrank enthält die Mutterlauge nur noch wenig Phyllin; die violettrote pulvrige Fällung wird auf dem Filter mit leichtflüchtigem Petroläther nachgewaschen.

Die Ausbeute beträgt 8,5 g reines Pyrrophyllin (d. i. drei Viertel der Theorie) und 0,6 g Rhodophyllin.

Weniger vollständig und nicht ganz so leicht wurde das Phyllin anstatt durch Fällung aus stark eingeengter Ätherlösung krystallisiert erhalten. Aus der leuchtend roten Flüssigkeit krystallisiert es sehr rein in Drusen von stahlblau glänzenden oder rötlich graublauen, spitzwinkligen Tafeln.

Gewinnung aus Rhodophyllin. 5 g rohe Krystallisation desselben werden mit 200 ccm konzentriertem methyl-

alkoholischem Kali $3^1/_2$ Stunden lang im Silbertiegel mittels des Pfungstautoklaven auf 225—230° Ölbadtemperatur erhitzt. Die tiefrote alkalische Flüssigkeit liefert beim Verdünnen mit 300 ccm Wasser eine vollständige Fällung von flockigem Pyrrophyllinkalium.

Umkrystallisation[1]). Beim Umkrystallisieren aus absolutem Äther erfährt das Pyrrophyllin eine Änderung, die nicht am chemischen Verhalten, aber an der Löslichkeit und Farbe kenntlich ist. Diese wird bei der Behandlung mit Lösungsmitteln immer weniger blaustichig; die Absorption im roten Teil des Spektrums geht zurück. Die Rohlösung der Substanz ist blauer als Rhodophyllin, aber schon beim Wiederauflösen des Rohproduktes ist Pyrrophyllin weniger blau; es tingiert dann schön violett. Umkrystallisiertes Pyrrophyllin gibt eine fuchsinähnliche, rein rote, gelbrot fluorescierende Ätherlösung, welcher der stark blaue Ton fehlt. Mit dieser Änderung geht die Abnahme der Löslichkeit in trockenem Äther Hand in Hand. In diesem löst sich das feingepulverte Rohprodukt noch sehr leicht und schnell; es ist auch nötig, die Lösung rasch herzustellen und zu filtrieren, damit die Wiederabscheidung nicht zu schnell erfolgt. Wir nahmen 3 g Substanz in wenigen Minuten in 150 ccm absolutem Äther auf und engten auf die Hälfte ein. Dann krystallisierte das Pyrrophyllin schnell aus (1,7 g) und bei etwas weiterem Einengen noch 0,35 g in wunderschönen, rotvioletten, stark glänzenden Prismen, die unter dem Mikroskop sechsseitigen Umriß zeigten und in der Durchsicht rubinrot erschienen. Wendet man hingegen feuchten Äther zum Umkrystallisieren an, so behält das Pyrrophyllin die Leichtlöslichkeit des Rohproduktes und verhält sich auch wie dieses bei der Trocknung.

Das aus wasserfreiem Äther umkrystallisierte Präparat enthält Krystalläther, welchen es bei 105° im Vakuum außerordentlich schwer verliert.

Phyllophyllin aus Isochlorophyllin (a + b).

Die alkalische Isochlorophyllinlösung aus 10 g Methylchlorophyllid (siehe Kap. XVIII, Abschn. 1) wird in den silbernen

[1]) Ann. d. Chem. 371, 74 [1909].

Einsatz des Pfungstautoklaven, der 300 ccm faßt, eingefüllt und mit einer Asbestplatte zugedeckt. Wir heizen mit Thermometer im Ölbad langsam auf 140° und halten 2—3 Stunden die Temperatur der Cyanophyllinstufe ein, d. i. 140—150°; sodann steigern wir sie langsam auf 170° (Rubiphyllinbildung) und nach einer weiteren Stunde auf 180—190° (Zersetzung des Rubiphyllins, Bildung von Erythrophyllin). Hier halten wir die Temperatur 2—3 Stunden konstant und lassen sie endlich zur Umwandlung des Erythrophyllins noch 2—3 Stunden von 190—205° ansteigen (18 Atm. Druck entsprechend 195° Innentemperatur unseres größeren Autoklaven).

Aus dem Reaktionsprodukt ist durch Verdünnen mit dem doppeltem Volumen Wasser das Kaliumsalz quantitativ in körnig krystallinischer Form abgeschieden worden Das abfiltrierte Salz verreiben wir mit 200 ccm Wasser und etwas Äther, verdünnen es mit $^1/_2$ l Sprit und tragen es in 4—5 l Äther ein. Die sehr feine Suspension von Phyllophyllinkalium, das sich auch teilweise im Äther löst, säuern wir durch Schütteln mit 20 g groben Krystallen von Mononatriumphosphat an, waschen die ätherische Lösung mit mäßig starker Phosphatlösung und entfernen daraus den Alkohol mit viel destilliertem Wasser. Dann wird etwas Dicarbonsäure, nämlich Erythrophyllin, durch Ausziehen mit 0,03 prozentigem Ammoniak entfernt. Nach erneutem Waschen mit primärem Phosphat und Wasser schütteln wir das Phyllophyllin wiederholt mit 1 bis $1^1/_2$ l Kalkwasser tüchtig durch. Beim ersten Male bilden sich einige Flocken aus verdorbenem Phyllin. Die Ätherlösung von Phyllophyllincalcium dampft man, ohne sie zu waschen, nach dem Trocknen über Chlorcalcium auf etwa 200 ccm ein, wobei ein Teil des Calciumsalzes als feiner krystallinischer Brei ausfällt. Der Rest krystallisiert fast vollständig aus dem Filtrat beim Versetzen mit dem gleichen Volumen Sprit. Die Mutterlauge enthält ein wenig von einem andern Phyllin, dessen magnesiumfreies Derivat in Äther grün ist und erst in 7 prozentige Salzsäure geht.

Die ammoniakalischen Erythrophyllinauszüge werden mit primärem Phosphat angesäuert und in Äther übergeführt; bei starkem Einengen erhält man daraus das Nebenprodukt in schönen Krystallen, z. B. 1,1 g.

Die Ausbeute an Phyllophyllincalcium beträgt etwa 70% der Theorie, nämlich 6 g.

Die Isolierung in der Form des Salzes ist wegen seiner Beständigkeit beim Abdampfen der Lösung und beim Aufbewahren zweckmäßig. Das freie Phyllophyllin verliert sein Magnesium leichter als die Pyrroverbindung und die meisten anderen Phylline. Nur in Verdünnung ist die Lösung der freien Säure existenzfähig und die Zersetzung zeigt sich schon in geringem Maße bei kurzem Stehen einer frisch bereiteten ätherischen Lösung, wobei ihr Absorptionsspektrum mehr und mehr den für Phylloporphyrin charakteristischen Doppelstreifen im Orange aufweist.

Bei längerem Stehen der ätherischen Lösung und namentlich beim Abdampfen, sogar bei vorsichtigstem Einengen im Vakuum bei niederer Temperatur, unterliegt die gesamte Substanz dieser Spaltung; in der stärkeren Konzentration der Lösung von Phyllophyllin wirkt diese Säure auf den Komplex des eigenen Moleküls ansäuernd und infolgedessen rasch zersetzend. Beim Eindampfen der Phyllophyllinlösung erhält man eine Krystallisation von Phylloporphyrin, während das abgespaltene Magnesium einen Teil des Phyllophyllins neutralisiert zu ätherlöslichem Magnesiumsalz; dieses findet man im Filtrat vom Porphyrin. Dem Magnesiumsalz fehlt das Tingieren des freien Phyllins, säuert man seine Ätherlösung an, so wird die alte Farbe wieder hergestellt.

Phyllophyllin aus Phäophytin (a + b).

In den früheren Arbeiten war beobachtet worden[1]), daß aus Phäophytin und Phytochlorin e beim Erhitzen mit methylalkoholischem Kali schon bei 140—150° Phylloporphyrin entsteht. Wir machen nun von einer der im vorigen Kapitel beschriebenen Methoden von Willstätter und Forsén für die Einführung des Magnesiums Anwendung, um aus den zwei Phäophytinkomponenten durch Einwirkung von Magnesia und methylalkoholischem Kaliumhydroxyd Phyllophyllin zu gewinnen, ebenso wie dort schon seine Bildung aus dem Phytochlorin allein angeführt worden

[1]) Ann. d. Chem. 371, 98 [1909] und Ann. d. Chem. 382, 183 [1911].

ist. Die Reaktionstemperatur ist für die Magnesiumverbindung höher als für die magnesiumfreie. Um die b-Verbindung zu dem gewünschten Endprodukt abzubauen, ist ein Zusatz von Pyridin erforderlich, das bei der Umformung einer sauerstoffhaltigen Gruppe wirksam ist.

20 g fein zerteiltes Phäophytin trugen wir allmählich in 200 ccm siedende 40proz. methylalkoholische Kalilauge ein, die mit 25 ccm Pyridin und 5 g MgO versetzt war. Nach beendeter Auflösung enthält die tiefgrüne Masse, die beim Verdünnen olivfarbig wird, nur Phytochlorin e und Rhodin g und nur Spuren von Flocken. Dann fügten wir weitere 25 ccm Pyridin hinzu und erhitzten im Silbertiegel des Pfungstautoklaven auf 140°. Wir hielten die Temperatur 2 Stunden bei 140°, 1 Stunde 140—160°, 2 Stunden 160°, 2 Stunden 175—180°, langsam 180—205°, 3 Stunden 205°. Bei der Reaktion hat sich Gas gebildet, das Manometer zeigte 22, nach dem Erkalten 7 Atm. Druck an. Die Reaktion ist in der Hauptsache bis zum Phyllophyllin gegangen, neben welchem aber noch ziemlich viel Erythrophyllin vorhanden war.

Um das Pyridin zu beseitigen, wurde das gefällte und abfiltrierte Phyllinkalium mit Wasser zu einem Brei verrührt und im Scheidetrichter durch 2 l Äther in dünnem Strahl hindurchgegossen; diese Behandlung haben wir wiederholt. Die weitere Isolierung geschah mit primärem Phosphat und alkoholhaltigem Äther und durch Überführen in Calciumsalz wie im vorigen Abschnitt. Die Ausbeute an Phyllophyllincalcium betrug 6,7 g, dazu kamen 2,2 g mit 0,03 prozentigem Ammoniak abgetrenntes Erythrophyllin.

3. Zwischenprodukte des Abbaus.

Reihe des Chlorophyllins a.

Glaukophyllin.

Die erste Zwischenstufe der Decarboxylierung von Chlorophyllin a haben Willstätter und Fritzsche[1]) aus Kaliumsalz dargestellt, das sie durch Verseifung von Brennesselextrakten in der

[1]) Ann. d. Chem. 371, 62 [1909].

Kälte gewannen. Das rohe Chlorophyllinsalz (45% reine Kaliumverbindung enthaltend) wurde in Chargen von 30 g mit 250 ccm konzentrierter holzgeistiger Kalilauge $6^1/_2$ Stunden lang auf 140° erhitzt.

Das Reaktionsprodukt ist zum größten Teil in der erkalteten Lauge gelöst; sie ist am Glasstab tief grünlichblau, aber schon in mäßiger Schicht rot gefärbt. Beim Verdünnen mit 350 ccm Wasser fällt das rohe Kaliumsalz in grünen Flocken aus und läßt sich auf Hartfiltern absaugen. In der Mutterlauge bleibt chlorophyllinartige Substanz gelöst.

Das noch feuchte Salz wird in der Reibschale mit Alkohol zu einem Brei angerieben, mit $^1/_2$ l Alkohol verdünnt und in 3 l Äther eingetragen. Die feine Suspension säuert man mit etwa 30 ccm konzentrierter Monophosphatlösung an; das Glaukophyllin geht leicht in den alkoholhaltigen Äther über. Dann wird der Alkohol mit Wasser herausgewaschen; dabei färbt sich die wässerige Schicht grün an und zugleich scheidet der Äther, indem er ärmer an Alkohol wird, eine voluminöse farblose Verunreinigung aus. Gutes Chlorophyllinmaterial liefert schön blaue Rohlösungen von Glaukophyllin, die blutrot fluorescieren.

Die weitere Behandlung der Glaukophyllinlösung besteht in der Abtrennung zunächst von schwächer sauren, sodann von stärker sauren chlorophyllinartigen Begleitern. Zu diesem Zweck extrahieren wir fürs erste mit sehr verdünntem Ammoniak; beim Rhodophyllin ist oben 0,03 prozentiges angewendet worden, hier empfiehlt es sich mit noch verdünnterem zu arbeiten. Glauko- und Rhodophyllin gehen aus verdünnter ätherischer Lösung leicht und vollständig in $n/_{500}$-Ammoniak, dagegen nur spurenweise in $n/_{5000}$-Ammoniak. Man schüttelt mit je $1^1/_2$—2 l ca. 0,004 prozentigem Ammoniak erschöpfend aus, d. i. fünf- bis sechsmal; der Äther ist, wenn reines Chlorophyllinsalz verarbeitet worden, nicht mehr grün. Die ammoniakalische Lösung ist blau und fluoresciert sehr stark rot, beim Stehen wird sie trüb olivfarbig, indem das Salz in äußerst feiner Verteilung ausfällt. Aus dem Ammoniak wird das Glaukophyllin durch Ansäuern mit sehr wenig primärem Phosphat wieder unter Zusatz von etwas Alkohol in Äther (2 l) gebracht und diese Lösung wird öfters mit verdünntem Dinatriumphosphat (0,02—0,05 pC) durch-

geschüttelt. Das Reagens beseitigt eine Beimischung, indem es sich drei- bis viermal blaugrün anfärbt; Glaukophyllin aber geht schon in 0,1 prozentiges Dinatriumphosphat nur noch spurenweise.

Jetzt ist die ätherische Lösung rein und prächtig blau gefärbt. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat dampft man sie auf 25 bis 30 ccm ein; erst aus der sehr konzentrierten Lösung krystallisiert beim Erkalten und kurzem Stehen das Glaukophyllin in glänzenden kleinen Prismen von blauer Oberflächenfarbe, ähnlich dem Rhodophyllin. Die Ausbeute beträgt 1,7 g.

Umkrystallisation. Glaukophyllin läßt sich am besten aus wasserfreiem Äther umkrystallisieren. Dabei geht es in eine ätherunlösliche Modifikation über und die Farbe seiner Lösung wird ähnlich wie bei Pyrrophyllin mehr violett. Wir haben 2 g in 2 Portionen fein gepulvert mit je $^3/_4$ l absolutem Äther 5 Minuten lang gekocht. Dabei wurde ein Teil des Pulvers (0,45 g) grobkrystallinisch und blieb ungelöst; aus dem Äther schied sich schon während des Einengens auf dem Wasserbad das Glaukophyllin aus in einer schönen einheitlichen Krystallisation (1,2 g) regelmäßiger Prismen von der Form länglicher Rhomben.

Rhodophyllin[1]).

Während früher der Gehalt an Isochlorophyllin und an Chlorophyllin b im Ausgangsprodukt die Darstellung von reinem Rhodophyllin erschwerte, ist nun in dem Kaliumsalz, das eine gereinigte Chlorophyllösung bei kalter Verseifung liefert, ein sehr geeignetes Ausgangsmaterial gefunden worden; es enthält fast keine andere Chlorophyllsubstanz als Chlorophyllin a.

10 g 65prozentiges Chlorophyllinsalz a werden mit 200 ccm 35prozentiger methylalkoholischer Kalilauge im Autoklaven langsam auf 130° Innentemperatur erhitzt. Nach 2 Stunden steigern wir diese auf 160° und lassen sie in 2 weiteren Stunden nicht über 165° gehen. Auch unter diesen gelinden Bedingungen geht schon ein beträchtlicher Teil des Rhodophyllins in Pyrrophyllin über.

Aus der alkalischen Flüssigkeit wird alles Phyllinsalz durch Verdünnen mit dem doppeltem Volumen Wasser ausgefällt, um

[1]) Abh. V; das hier mitgeteilte Verfahren ist neu.

wie bei den andern Phyllinen das Ansäuern der alkalischen Flüssigkeit zu vermeiden. Den abfiltrierten und mit etwas Wasser nachgewaschenen flockigen Niederschlag rühren wir mit Wasser, dem doppelten Volumen Alkohol und etwas Äther an, tragen ihn in 5 l Äther ein und führen in diesen das Phyllin durch Ansäuern mit primärem Phosphat über. Es entsteht eine prachtvolle rote Lösung, die noch mit Phosphat und mit destilliertem Wasser gewaschen wird. Das Rhodophyllin läßt sich vom Pyrrophyllin mit sehr verdünntem Ammoniak trennen, das die eincarboxylige Verbindung nicht aufnimmt; bei einer geringen Beimischung von Pyrrophyllin genügt es aber, das Rhodophyllin aus verdünnter ätherischer Lösung krystallisieren zu lassen.

Zum Ausziehen des Phyllins waren 10 l 0,03 prozentiges Ammoniak erforderlich; daraus brachten wir durch Ansäuern mit festem Phosphat das Rhodophyllin wieder in viel alkoholhaltigen Äther (ca. 5 l) und entfernten den Alkohol durch gründliches Auswaschen mit viel Wasser. Nach raschem Einengen auf 1 l filtrierten wir die Lösung und konzentrierten sie weiter. Schon aus der warmen noch verdünnten Lösung schied sich das Rhodophyllin in glitzernden Krystallen von blauer bis violetter Oberflächenfarbe aus.

Nach dem Ausschütteln mit verdünntem Ammoniak enthielt der Äther noch das Pyrrophyllin; die Lösung wurde mit Phosphat und mit Wasser gewaschen und nach dem Einengen mit Petroläther gefällt.

Die Ausbeute beträgt 2,2 g Rhodophyllin und 1,0 g Pyrrophyllin.

Rhodophyllin läßt sich gut aus feuchtem Äther umkrystallisieren, wovon 3 l zum Lösen von 2 g am Rückflußkühler erforderlich sind; die Substanz krystallisiert nach dem Einengen in einzeln ausgebildeten Prismen von bläulichroter Oberflächenfarbe.

Reihe des Isochlorophyllins a.

Cyanophyllin und Erythrophyllin[1]).

In der Isochlorophyllinreihe werden die verschiedenen Stufen des Abbaus glatter und bei niedrigerer Temperatur erreicht, wenn

[1]) Abh. XXII.

die Einwirkung der methylalkoholischen Kalilauge bei Gegenwart einer bedeutenden Menge von Pyridin erfolgt. So entsteht aus dem Produkt der heißen Verseifung beim Erhitzen im Autoklaven mit der dreifachen Menge von Pyridin und der zehnfachen von methylalkoholischer Lauge bei 150—155° in 4—5 Stunden einheitliches Cyanophyllinsalz. Es ist in alkoholischer Kalilauge und auch in Wasser leicht löslich und läßt sich nur mit Kochsalz als eine zähe Masse ausfällen. Bei vorsichtigem Isolieren durch saures Phosphat bei Gegenwart von Äther entsteht eine wunderbar blaue, intensiv fluorescierende Lösung. Sie ist aber so unbeständig, daß sie schon bald beim Stehen trübe und grau wird infolge des Austritts von Magnesium aus dem Komplex. Man kann daher das Cyanophyllin nicht durch Eindampfen, wohl aber durch Fällen mit Petroläther in Substanz abscheiden.

Viel beständiger als die dem Glaukophyllin entsprechende Stufe ist das Analoge des Rhodophyllins.

Zur Gewinnung von Erythrophyllin wurde Chlorophyll a in Portionen von 1 g, mit 3 ccm Pyridin verdünnt, der heißen Verseifung mit 10 ccm methylalkoholischer Kalilauge unterworfen und im Silbertiegel 5 Stunden lang auf 175—180° im Einschlußrohr erhitzt. Bei genauer Einhaltung der Temperatur war das Reaktionsprodukt fast einheitlich. Eine Probe gibt bei der Spaltung mit Säure ein Porphyrin, das beim Schütteln der ätherischen Lösung mit 2prozentiger Salzsäure diese infolge der Unlöslichkeit des Chlorhydrats garnicht anfärbt; die Cyano- und die Phylloverbindung würden in die Säure übergehen.

Das Kaliumsalz ist schwer löslich und fiel beim Verdünnen gut aus, während ein wenig beigemischtes Cyanophyllin vollständig in der Mutterlauge blieb. Die Ausbeute an Erythrophyllinkalium betrug 0,6 g.

Zur Isolierung des Erythrophyllins lösten wir 2,5 g Kaliumsalz feingepulvert in Sprit und brachten die Carbonsäure mit Hilfe von primärem Phosphat in 4 l reinen Äther, woraus durch häufiges Waschen der Alkohol entfernt wurde. Die schöne kirschrote Ätherlösung erforderte keine weitere Reinigung; nach dem Einengen auf 60 ccm schied sich eine kleine Menge zersetzten Produktes ab, dann

erfolgte nach dem Abfiltrieren und Konzentrieren bis auf 20 ccm eine reichliche Krystallisation von schönem Erythrophyllin in rhombenförmigen Täfelchen (1,2 g). Es war zweckmäßig, die Mutterlauge auf das Porphyrin zu verarbeiten.

Aus der Chlorophyllkomponente b.

Rubiphyllin[1]).

Aus dem Isochlorophyllin b entsteht zuerst bei 150—155° ein sehr zersetzliches Phyllin, das in alkoholischer Lauge blaue Farbe und starke Fluorescenz zeigt und in ätherischer Lösung grün ist. Das entsprechende Porphyrin geht aus seiner roten ätherischen Lösung in 3prozentige Salzsäure mit tief blaugrüner Farbe.

Das schönere und beständigere Phyllin der folgenden Abbaustufe ist rein dargestellt worden.

Methylchlorophyllid b (0,7 g) lösten wir in Pyridin (2 ccm) und trugen es in 7 ccm siedende methylalkoholische Kalilauge ein; zur vollständigen Verseifung wurde weitere 5 Minuten über einer kleinen Flamme erhitzt. Wir führten die blutrot fluorescierende Lösung mit weiteren 10 ccm Lauge in ein silbernes Reagierrohr über, um sie im aufrechtstehenden Einschlußrohr 3 Stunden auf 165—170° im Ölbad zu erhitzen. Beim Verdünnen des Rohrinhaltes mit dem gleichen Volumen Wasser schied sich das Kaliumsalz aus, vollständiger beim Aussalzen mit Chlorkalium.

Das nach dem Trocknen blauviolett glänzende Rubiphyllinkalium wird in wenig Alkohol gelöst und durch Eingießen in 200 ccm Äther feinflockig suspendiert. Dann gelingt es beim Ansäuern mit Mononatriumphosphat, das freie Phyllin ohne Abscheidung schwer löslicher Flocken glatt in den Äther zu bringen. Die Lösung ist violettstichig rot und fluoresciert intensiv. Der Alkohol wird daraus durch wiederholtes Waschen mit im ganzen etwa 10 l Wasser entfernt und das Volumen der Lösung durch Nachfüllen von alkoholfreiem Äther konstant erhalten. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat gibt die Lösung bei raschem Abfiltrieren bis auf 1 oder höchstens 2 ccm einen Brei von Krystallblättchen des reinen Rubiphyllins (0,5 g).

[1]) Abh. XXII.

Dem Rohprodukt von Rubiphyllinsalz ist häufig schon etwas Phyllophyllinkalium beigemischt; in solchen Fällen trennt man die beiden Phylline durch zwei- bis dreimaliges Ausschütteln ihrer ätherischen Lösung mit 0,03prozentigem Ammoniak. Das Rubiphyllin geht ohne Flockenbildung mit tiefroter Farbe in das Ammoniak, das zu verdünnt ist, um mit Phyllophyllin zu reagieren.

Auch aus magnesiumfreien Derivaten des Chlorophylls b ist Rubiphyllin nach der Methode von Willstätter und Forsén dargestellt worden, und es ist dadurch leicht zugänglich.

2 g Methylphäophorbid b werden nach und nach in 20 ccm siedendes methylalkoholisches Ätzkali eingetragen und mit 2 g MgO im Einschlußgefäß $3^1/_2$ Stunden lang auf 170° erhitzt. Es empfiehlt sich auch hier, das Phyllin mit sehr verdünntem Ammoniak zu reinigen. Seine Ausbeute erreicht die Hälfte der Ausgangssubstanz.

4. Gewinnung der Porphyrine.

Aus den Phyllinen.

Die Phylline sind empfindlich gegen Säure, sie verlieren leicht das Magnesium und bilden die Porphyrine, die aber bei zu raschem Ausfällen aschehaltig bleiben können. Beim Schütteln der Ätherlösungen mit Salzsäure von mittlerer Konzentration lassen sich alle Phylline quantitativ in die reinen Porphyrine umwandeln; diese werden aber beim Verdünnen und Neutralisieren nur schwierig wieder in Äther übergeführt. Handelt es sich nur um die rasche und vollständige Abscheidung in aschefreiem Zustand, z. B. von Phylloporphyrin aus Phyllophyllincalcium, so neutralisiert man einfach die salzsaure Flüssigkeit ziemlich genau, wobei das Porphyrin in mikrokrystallinischen Flocken ausfällt. Einige Beispiele sollen zeigen, wie trotz ihrer ungemein geringen Löslichkeit die Porphyrine in schönen einheitlichen Krystallisationen dargestellt werden.

Rhodoporphyrin[1]). Rhodophyllin geht bei raschem, kräf-

[1]) Ann. d. Chem. 358, 243 [1907] und 371, 91 [1909].

tigem Anschütteln mit viel Eisessig z. B. 10—12 ccm für 5 bis höchstens 10 mg klar in Lösung, und aus der dunkelroten Flüssigkeit fällt das Porphyrin sofort in prächtig flimmernden Krystallblättchen aus, die sich auf dem Filter zu einem graublauen, seidenschimmernden Netz verfilzen. Handelt es sich nicht um ganz kleine Mengen, so nimmt man viel besser das Phyllin unter gelindem Erwärmen in Pyridin auf und läßt die Lösung langsam in viel Eisessig einfließen; das Porphyrin fällt rasch in glänzenden rotbraunen Stäbchen aus.

Pyrroporphyrin[1]) erhält man aus seinem Phyllin leicht in Eisessig, da es darin zwar in der Wärme leicht, aber zum charakteristischen Unterschied von Phylloporphyrin in der Kälte schwer löslich ist. Wir lösen z. B. 1,5 g Pyrrophyllin (15% gebundenen Äther enthaltend) bei gewöhnlicher Temperatur oder gelinder Wärme in 80 ccm Eisessig. Sobald die Lösung filtriert ist, beginnt das Porphyrin in Blättchen von lebhaftem, blaugrauem Oberflächenglanz zu krystallisieren. Die Ausbeute ist fast quantitativ (1,25 g), aber erst durch nochmaliges Krystallisieren aus Eisessig werden die Präparate gänzlich aschefrei.

Erythroporphyrin[2]). Das fein gepulverte Erythrophyllin (0,5 g) tragen wir in konzentrierte Salzsäure (100 ccm) ein, die zuvor mit etwas Äther versetzt worden ist. Aus der klaren, roten Lösung wird die gebildete magnesiumfreie Säure extrahiert, indem man 10 l Äther und 1 l Alkohol hinzufügt und mit Wasser verdünnt. Die große Äthermenge und der Alkoholzusatz sind nicht zu vermeiden, weil sonst ein Teil des Porphyrins schon beim Überführen in den Äther ausfällt. Die hellrote Ätherlösung kann nur bei vorsichtigem Durchfließenlassen von Wasser alkoholfrei gemacht werden, ohne daß schon die Krystallisation erfolgt. Auch beim Filtrieren fällt leicht schon ein Teil aus. Bei nur mäßigem Einengen krystallisiert aus dem Äther in seidenglänzenden Prismen das Erythroporphyrin fast quantitativ, so daß das Filtrat nur eine schwach rötliche Farbe zeigt.

---

[1]) Ann. d. Chem. 371, 95 [1909].
[2]) Abh. XXII.

Aus den magnesiumfreien Chlorophyllderivaten.

Da die Phylline leichter als die Porphyrine gereinigt werden können, wird man bei der Verarbeitung von Phäophytin oder Phytochlorin auch auf Porphyrine den Weg der Einführung von Magnesium (mit MgO), also die Phyllinbildung, vorziehen. Es gelingt aber auch direkt zu den Porphyrinen abzubauen und zwar entsteht z. B. aus Phytochlorin e beim Erhitzen mit methylalkoholischer Lauge schon bei 140—150° in einigen Stunden das Phyllophorphyrin[1]).

Hingegen liefern die schwachbasischen Phytochlorine Pyrroporphyrin[2]), nämlich Chlorin g bei 225—230°, Chlorin f bei längerem Erhitzen auf 200°, nachdem es sich zuerst bei 140—150° glatt in Rhodoporphyrin umgewandelt hat.

Das Pyrroporphyrin scheidet sich als schwerlösliches Kaliumsalz aus der alkalischen Flüssigkeit ab; seine Salzsäurezahl $1^1/_2$ und die geringere Löslichkeit in kaltem Eisessig unterscheiden es vom Phylloporphyrin.

Schwieriger ist die Umwandlung von Derivaten des Chlorophylls b in Porphyrine.

Das Phytorhodin g ist gegen konzentrierte Alkalien unbeständig. Es wird dadurch schon bei Wasserbadtemperatur, rasch bei 140° in eine ätherunlösliche, amorphe braune Substanz verwandelt. Die Porphyrinbildung, der die Reduktion einer sauerstoffhaltigen Gruppe voranzugehen scheint, gelingt uns bei Gegenwart von viel Pyridin.

Phytorhodin g liefert dann schon bei verhältnismäßig niederer Temperatur fast glatt Phylloporphyrin[3]). 0,4 g Phytorhodin g wurden in 10 ccm Pyridin gelöst und mit 12 ccm methylalkoholischer Kalilauge 6 Stunden auf 150—155° erhitzt. Beim Ansäuern des Kaliumsalzes und Ausäthern fielen nur wenige ätherunlösliche Flocken aus. Zur Reinigung von schwächerbasischen Beimischungen ist das Porphyrin aus dem Äther mit 2prozentiger Salzsäure ausgezogen und daraus wieder in Äther übergeführt worden. Beim

---

[1]) Ann. d. Chem. 371, 98 [1909] und Ann. d. Chem. 382, 183 [1911].
[2]) Ann. d. Chem. 382, 183 [1911].
[3]) Abh. XXII.

Einengen krystallisierten 0,25 g Phylloporphyrin in scharfbegrenzten rhombischen Täfelchen aus.

Phytorhodin k und i gaben auch ohne Zusatz von Pyridin bei dreistündigem Erhitzen auf etwa 200° in glatter Reaktion Pyrroporphyrin[1]).

5. Beschreibung der Phylline.

Die Dicarbonsäuren $[MgN_4C_{31}H_{32}](COOH)_2$.

Glaukophyllin[2])

krystallisiert mit einem Mol Äther in blauglänzenden, schräg abgeschnittenen Prismen (Fig. 1 der Tafel V), die in der Durchsicht unter dem Mikroskop grün erscheinen. Das aus der Rohlösung auskrystallisierte Präparat löst sich in trockenem Äther beträchtlich und zwar viel reichlicher als Rhodophyllin, in feuchtem Äther noch leichter, in Aceton leicht, in Alkohol beträchtlich, aber nicht leicht. In Chloroform und Benzol ist es unlöslich.

Nach dem Umkrystallisieren oder längerem Schütteln mit wasserfreiem Äther ist Glaukophyllin hingegen in Äther unlöslich.

Die frisch bereitete Glaukophyllinlösung ist von wunderbar blauer Farbe und fluoresciert intensiv rot; mit Lösungsmitteln behandeltes, namentlich umkrystallisiertes Glaukophyllin löst sich violett, aber die Farbe ist im Vergleich mit Rhodophyllin doch noch blau.

Von 0,01 proz. Natronlauge wird Glaukophyllin aus ätherischer Lösung quantitativ extrahiert mit violetter Farbe, die Lösung verändert sich beim Stehen; auch 0,5 proz. Dinatriumphosphat extrahiert mit anfangs violetter, aber bald trübe roter und bei längerem Stehen brauner Farbe.

Cyanophyllin[3]).

Es gleicht dem Glaukophyllin in der Farbe der Lösungen, die auch allmählich rotstichig werden. Das freie Phyllin ist unbeständig, es krystallisiert in spindelähnlichen Formen.

---

[1]) Ann. d. Chem. 382, 194 u. Abh. XXII.
[2]) Ann. d. Chem. 371, 66 [1909].
[3]) Abh. XXII.

Zum Unterschied von Glaukophyllin wird es von 0,003 prozentigem Ammoniak nicht aus Äther extrahiert, im Gegensatz zu Erythrophyllin geht es noch in 0,2—0,3 prozentiges Dinatriumphosphat; es steht also in den sauren Eigenschaften zwischen diesen Isomeren.

Rhodophyllin[1])

krystallisiert, gleichfalls fest gebundenen Äther enthaltend, in Prismen mit ungleich geneigten und ausgebildeten Enddomen, die oft in wetzstein- und spindelähnliche Formen (Fig. 2 der Tafel V) übergehen. Überraschend ist das Verhalten der feingepulverten Substanz gegen wasserfreien Äther: indem ein ganz kleiner Teil vorübergehend gelöst wird, verwandelt sich das Pulver rasch in neue, prächtig glitzernde dunkelrote Krystalle, scharf ausgebildete Rhomben.

Die Lösungen sind kirschsaftähnlich blaustichig rot und zeigen intensive blutrote Fluorescenz.

Rhodophyllin ist leicht löslich in absolutem Alkohol (1 g heiß in 250 ccm) und Aceton, ziemlich schwer in Holzgeist, noch schwerer in Äther, unlöslich in Chloroform, dagegen spielend in Pyridin löslich.

Es wird aus ätherischer Lösung von sehr verdünnten Alkalien z. B. von 0,3 prozentigem Dinatriumphosphat und von 0,01 prozentigem Kaliumhydroxyd vollständig extrahiert; 0,1 prozentige Kalilauge löst Rhodophyllin mit braunroter Farbe, grün tingierend.

Rhodophyllinkalium. Fügt man zur heißen alkoholischen Lösung von Rhodophyllin überschüssiges methylalkoholisches Kali, so erfolgt eine Aufhellung der Flüssigkeit, ihr blauer Ton verschwindet, während die Fluorescenz sich nicht ändert. Dann fällt das Dikaliumsalz schnell in schweren, lebhaft flimmernden Krystallen, Prismen und Nädelchen von blauer Oberflächenfarbe aus; die Flüssigkeit wird fast farblos. Kalte alkoholische Lösungen zeigen dieselbe Reaktion langsamer, sie tritt noch in großer Verdünnung ein. Beim Verreiben des trockenen Salzes mit Methylsulfat entsteht der Dimethylester, der in violetten Prismen krystallisiert.

---

[1]) Ann. d. Chem. 358, 223 [1907] und Ann. d. Chem. 371, 71 [1909].

Erythrophyllin[1])

krystallisiert aus Äther in spitzen rhombenförmigen Täfelchen und ist dann in Äther nur noch wenig, aber in absolutem Alkohol leicht löslich. Vor dem Krystallisieren ist die ätherische Lösung kirschrot, indessen viel weniger blau als die von Rhodophyllin; die Krystalle geben eine rein rote, fluorescierende Lösung ohne blauen Ton.

Erythrophyllin ist deutlich schwächer sauer als Rhodophyllin, indem es von 0,01 prozentiger Kalilauge nicht extrahiert wird; 0,1 prozentige fällt Erythrophyllinkalium aus. Von Ammoniakgas wird die trockene Ätherlösung des Rhodophyllins gefällt, während Erythrophyllin als Ammonsalz gelöst bleibt. Auch von Kalkwasser wird Erythrophyllin nicht gefällt.

Der Dimethylester bildet rote Prismen, die in Äther schwer löslich sind.

Rubiphyllin[2])

ist bei der Isolierung in Äther sehr leicht löslich, nach dem Umkrystallisieren aber darin unlöslich; in Alkohol löst es sich ziemlich leicht. Es bildet dreieckige Blättchen, seltener Rhomben. Die ätherische Lösung ist violettstichig rot, weniger blau als die von Rhodophyllin, nicht grünlich tingierend wie Phytorhodin; auch Pyridin löst Rubiphyllin gelblich rot, während Rhodophyllin darin blaurot ist.

Rubiphyllin wird von 1 prozentigem aber nicht von 0,5 prozentigem Dinatriumphosphat extrahiert und von 0,05 prozentigem Ammoniak, indessen nicht von 0,02 prozentigem; es ist schwächer sauer als die andern zweibasischen Phylline, sogar als Erythrophyllin.

Die Monocarbonsäuren $[MgN_4C_{31}H_{33}](COOH)$[3]).

Pyrrophyllin.

Es krystallisiert in Prismen (Fig. 3 der Tafel V), die an jedem Ende von einem Domenpaar begrenzt sind. Durch das Umkrystalli-

[1]) Abh. XXII.
[2]) Abh. XXII.
[3]) Abh. VIII.

sieren wird es nur in Äther sehr schwer löslich, es bleibt in Alkohol und Aceton leicht löslich. Auch in Chloroform, Schwefelkohlenstoff und warmem Benzol löst es sich leicht und es unterscheidet sich dadurch von den zweicarboxyligen Phyllinen.

Die ätherische Lösung verliert beim Schütteln mit 2n-Natron- oder Kalilauge ihren blauen Ton, dabei bilden sich ätherlösliche Alkalisalze. Verdünntere Lauge hingegen z. B. 0,1 prozentiges NaOH extrahiert das Pyrrophyllin mit intensiv roter Farbe gänzlich, 0,01 prozentiges färbt sich nur noch sehr wenig an, Dinatriumphosphatlösung reagiert nicht.

Beim Schütteln mit n-Ammoniak krystallisiert aus dem Äther das Salz in leuchtend roten Nädelchen aus (Unterschied von Phyllophyllin).

Calciumsalz. Wenn man auf die ätherische Lösung von Pyrrophyllinkalium Chlorcalcium einwirken läßt, so krystallisiert das Calciumsalz in hellroten Nädelchen aus. Es löst sich in Äther viel schwerer als das Phyllophyllinsalz und in Alkohol leichter als dieses, namentlich in der Wärme leicht.

Phyllophyllin

gibt eine blaustichig rote Ätherlösung mit roter Fluorescenz. Es ist in den physikalischen und in den chemischen Eigenschaften dem Isomeren sehr ähnlich, aber es verliert leichter das Magnesium. Gegen Alkalien verhält es sich wie Pyrrophyllin und reagiert gleichfalls mit Dinatriumphosphat nicht. Bei der Einwirkung von n-Ammoniak verteilt sich das Ammonsalz zwischen wässeriger und ätherischer Schicht und geht beim Aussalzen ganz in den Äther über.

Methylester (siehe Kap. XIX).

Phyllophyllincaesium. Die ätherische Lösung des Phyllophyllins verliert bei der Salzbildung mit Caesiumhydroxyd ihren blauen Ton, nach starkem Einengen krystallisiert die Caesiumverbindung schön aus. In größerer Menge erhält man sie am besten durch Versetzen einer auf dem Wege über das ätherlösliche Kaliumsalz konzentrierten ätherischen Phyllophyllinlösung mit mehr als dem gleichen Volumen Alkohol, worin Caesiumhydroxyd gelöst ist. Ein großer Teil des Caesiumsalzes scheidet sich prächtig

ab in blauviolett glänzenden derben, oft vierseitigen Säulen (Fig. 4 der Tafel V). Das Salz ist nicht löslich in Wasser, einmal auskrystallisiert auch nicht mehr in Äther, ziemlich leicht in siedendem Alkohol und Chloroform.

Phyllophyllincalcium. Am geeignetsten für die Isolierung des Phyllophyllins ist das Kalksalz, welches durch Schütteln der Ätherlösung mit Kalkwasser oder aus der ätherischen Kaliumsalzlösung mit Chlorcalcium dargestellt wird. Aus der mäßig eingeengten Lösung scheidet sich das Salz beim Vermischen mit einem Viertelvolumen Alkohol in mattvioletten Flocken ab.

Das Phyllophyllincalcium löst sich sehr leicht in Chloroform (das Phylloporphyrincalcium nur schwer) und wird durch Alkohol gefällt; 1 g wurde in 30 ccm Chloroform aufgenommen und die Lösung mit 20 ccm Alkohol verdünnt. Das Salz krystallisiert fast quantitativ in hellroten Nadeln aus.

In absolutem Alkohol läßt es sich bei raschem Arbeiten in kleinen Portionen auflösen; dann scheidet es sich bald in schönen Nadeln wieder ab, besonders rasch beim Erwärmen und ist in dem neuen Zustand unlöslich in Alkohol. Auch in Äther ist das Salz nicht mehr löslich, wenn es einmal ausgeschieden vorliegt.

6. Beschreibung der Porphyrine.

Die für die Erkennung der Porphyrine wichtige Verteilung zwischen Äther und Salzsäure ist in den Abschnitten 2 und 3 des XIV. Kapitels beschrieben worden (Salzsäurezahl, Verteilungszahl).

Glaukoporphyrin[1])

bildet rotviolette Nadeln und läßt sich durch Auflösen in Pyridin und Eintragen in viel heißen Eisessig umkrystallisieren. Es ist in Äther blaustichig rot, aber sehr wenig darin löslich, in krystallisierter Form löst es sich nicht mehr, auch nicht in Alkohol und Chloroform. Die Lösung des Porphyrins in Salzsäure ist violett, in verdünnter mehr blauviolett, in konzentrierter dunkelrotviolett und grünlich tingierend.

[1]) Abh. VIII.

Cyanoporphyrin[1])

entsteht beim Spalten des Phyllins mit starker Salzsäure in Form einer blaugrünen Salzlösung, die beim Verdünnen mit Wasser rein blau wird. Aus seiner ätherischen Lösung, die blaustichig rot ist, krystallisiert das Porphyrin erst beim Einengen in glänzenden rotbraunen Nadeln; sie lassen sich aus Eisessig umkrystallisieren.

Rhodoporphyrin[2])

krystallisiert aus Äther in zwei Formen, in glänzenden rotbraunen Nadeln und dunkelstahlblauen vier- und sechsseitigen Blättchen, die im durchfallenden Licht olivbraun sind. Krystallisiert ist es in den üblichen Solvenzien unlöslich. Das Chlorhydrat krystallisiert beim Verdünnen der Lösung in heißer konzentrierter Salzsäure mit $^1/_8$-Volumen heißem Wasser in dünnen Nädelchen vollständig aus.

Auf Zusatz von alkoholischem Kali löst sich das Porphyrin in Alkohol mit roter, etwas gelbstichiger Farbe; das Kaliumsalz krystallisiert allmählich in kurzen blauglänzenden Prismen aus. Auch in verdünnten wässerigen Alkalien löst sich Rhodoporphyrin, z. B. in kalter 1prozentiger Natronlauge, mit gelblichroter Farbe; beim Kochen fällt das Natriumsalz in äußerst feinen flimmernden Kryställchen aus.

Beim Erwärmen mit Essigsäureanhydrid verliert das Porphyrin 1 Molekül Wasser und bildet ein in Nadeln und rhombischen Blättchen krystallisierendes Derivat, das in Chloroform und Aceton schon kalt sehr leicht löslich ist.

Erythroporphyrin[3])

fällt schon aus verdünnter ätherischer Lösung in seidenglänzenden Prismen aus und ist in den üblichen Lösungsmitteln unlöslich außer in Pyridin und in den Säuren. Ätherhaltige 20prozentige Salzsäure löst es leicht mit rein roter Farbe; die Lösung tingiert zwar blau, ist aber viel weniger blaustichig als die des Rhodoporphyrins.

---

[1]) Abh. XXII.
[2]) Abh. V und VIII.
[3]) Abh. XXII.

Die basischen Eigenschaften lassen sich wegen der Unlöslichkeit des Chlorhydrats in verdünnter Salzsäure mit denen der Isomeren nicht genau vergleichen; der Methylester ist aber in Salzsäure leicht löslich, seine Salzsäurezahl liegt zwischen 5 und 7.

Rubiporphyrin[1])

krystallisiert in glänzenden braunroten, rhombenförmigen, oft gerundeten Blättchen, die in der Durchsicht olivstichig braun sind. Es ist dem Rhodoporphyrin ähnlich in der Löslichkeit, auch des Chlorhydrats, das gerade abgeschnittene Prismen bildet. Die Nuance der salzsauren Lösung geht mehr nach rot als bei Rhodoporphyrin.

Der Methylester, der schon aus sehr viel Äther in violettglänzenden, schief abgeschnittenen Prismen krystallisiert, gibt in Eisessig mit einem Tropfen konzentrierter Salzsäure eine grünrote Lösung, der Rhodoporphyrinester eine violettrote; die Salzsäurezahl des Rubiporphyrinesters ist $7^1/_2$.

Phyllo- und Pyrroporphyrin[2]).

Beide krystallisieren in dunkelroten Prismen mit violettem, metallischem Glanz; die Krystalle der Phylloverbindung sind zugespitzt (Figur. 6 der Tafel V), die des Pyrroporphyrins gerade abgeschnitten (Figur 5 der Tafel V). Die Pulver sind bräunlich bordeauxfarben, und zwar das von Phylloporphyrin mehr blaustichig, das von Pyrroporphyrin mehr braunstichig.

In Äther und kaltem Alkohol lösen sich die Substanzen sehr wenig, etwas mehr in heißem Alkohol, unlöslich sind sie in Benzol und Schwefelkohlenstoff, in Chloroform beim Kochen ziemlich leicht (Pyrro leichter), kalt nicht löslich, ähnlich in Aceton. Sehr leicht löslich sind sie in Pyridin.

Unterscheidend ist das Verhalten gegen Eisessig. Phylloporphyrin löst sich nämlich sehr leicht mit dunkelviolettroter Farbe und stark violettem Tingieren, das sich beim Erwärmen nicht ändert; Pyrroporphyrin löst sich im Eisessig erheblich schwerer und krystallisiert aus der heißen Lösung.

---

[1]) Abh. XXII.

[2]) Aus der Abh. VIII; siehe auch Ann. d. Chem. 382, 184 [1911].

Die Fluorescenz der beiden Porphyrine in Äther ist nur gering im Vergleich zu derjenigen der Phylline, bei Pyrro aber ganz deutlich, bei Phyllo sehr schwach. Diese Lösungen sind bräunlichrot, mit weniger blauer Nuance als bei Rhodo- und Glaukoporphyrin und zwar ist die von Pyrroporphyrin brauner.

Da die Salzsäurezahlen für Phylloporphyrin $^3/_4$, für Pyrroporphyrin $1^1/_2$ sind, so extrahiert 1 prozentige Säure bei Phylloporphyrin fast alles, bei Pyrroporphyrin weniger als die Hälfte aus der ätherischen Lösung.

Die Chlorhydrate zeigen einen großen Unterschied in der Löslichkeit; das Salz des Phylloporphyrins ist in Salzsäure leicht löslich, das von Pyrroporphyrin in mäßig verdünnter Salzsäure unlöslich.

Die Lösung von Phylloporphyrin in 6 prozentiger Salzsäure zeigt mit zunehmendem Substanzgehalt die Farben blauviolett, rotviolett, dann braunstichig rot mit grünlichem Tingieren. Pyrroporphyrin in Salzsäure ist rot mit nur geringem Blaustich, mit mehr Substanz viel blauer rot und blau tingierend.

Beide Porphyrine färben die tierische Faser schön und haltbar. Aus sehr verdünnt salzsaurer Lösung ziehen sie auf Seide mit wesentlich verschiedener Farbe, nämlich Pyrroporphyrin mit kupfrig roter Farbe, Phylloporphyrin stark dichroitisch; die Ausfärbung ist beim Darübersehen bronzebraun, in der Aufsicht grünlich bronzefarben und kupfrigrot.

Die einbasischen Porphyrine reagieren noch mit sehr verdünnten Alkalien quantitativ. 0,01 prozentige Natron- und Kalilauge nehmen aus dem Äther sofort den gesamten Farbstoff. Dabei entstehen in der Durchsicht klare, gelbstichig rote Lösungen, in der Aufsicht bemerkt man beim Schütteln, daß die Flüssigkeit von äußerst kleinen Partikeln erfüllt ist. Zusatz von stärkerer Lauge vermehrt die Fällung, unter dem Mikroskop sind dann deutlich braungelbe Nadeln zu erkennen.

Die Methylester der beiden Porphyrine, mit Holzgeist und Chlorwasserstoff gebildet, sind etwas schwächer basisch als die Carbonsäuren; die Salzsäurezahl der Phylloverbindung ist $1—1^1/_4$, die des Pyrroderivats $2^1/_2$. Die Ester sind viel leichter löslich als

Phylline	Glaukophyllin	Cyanophyllin	Rhodophyllin	Erythrophyllin	Rubiphyllin	Pyrrophyllin	Phyllophyllin
Farbe in Äther	blau	blau	blaurot	rot	violettstichig rot	blaustichig rot	blaustichig rot
in Chloroform	unlöslich					löslich	
von $n/_{10}$-Ammoniak	wird vollständig aus Äther extrahiert					unlöslich	
Löslichkeit des Ammonsalzes in Äther	unlöslich			löslich	unlöslich	unlöslich	löslich
Verhalten gegen Dinatriumphosphat	von 0,3 proz. aus Äther extrahiert			0,3 proz. wird sehr wenig angefärbt, geht reichlich in 0,5, vollständig in 1 proz	wird nicht von 0,5 proz. aber von 1 proz. aufgenommen	unlöslich	
Porphyrine	**Glauko-porphyrin**	**Cyano-porphyrin**	**Rhodo-porphyrin**	**Erythro-porphyrin**	**Rubi porphyrin**	**Pyrro-porphyrin**	**Phyllo-porphyrin**
Farbe in Äther	blaustichig rot		bräunlichrot	hellrot	rot	bräunlichrot	
Farbe in Salzsäure in 20 proz.	rotviolett	blaugrün	rotviolett	rein rot	stark rotstichig blau	blaustichig rot	braunstichig rot
Farbe in Salzsäure in 4 proz.	blauviolett	blau	blaustichig rot	violettrot	blaustichig rot	blaurot	violettrot
Löslichkeit d. Chlorhydrats in verd. Salzsäure	leicht löslich		schwer löslich	unlöslich	schwer löslich	schwer löslich	leicht löslich
Salzsäurezahl	$3^1/_2$	4	3	—	$4^1/_2$	$1^1/_2$	$^3/_4$

die freien Porphyrine, nämlich in Chloroform und Eisessig sehr leicht, in Aceton leicht, schwerer in Äther. Der Phylloporphyrinester krystallisiert aus Äther in rotviolett glänzenden, rhombenförmigen Tafeln, der Pyrroester in langen Prismen.

Vergleich der sauren Eigenschaften mit der Ammoniakmethode[1]).

Die Porphyrine unterscheiden sich in ihren sauren Eigenschaften wie die Phylline; Rubi- und Erythroporphyrin sind schwächer sauer als Rhodoporphyrin.

Ein Mittel für die Bestimmung der sauren Gruppen und für den Vergleich der saueren Eigenschaften bietet die Einwirkung von Ammoniakgas auf die zur Gewichtskonstanz getrockneten, feingepulverten Säuren. Bei der Dissoziation der gebildeten Ammonsalze unter gewöhnlichem und unter vermindertem Druck zeigen sich öfters charakteristische Unterschiede.

Rhodo-, Erythro- und Rubiporphyrin nehmen 2 Mole Ammoniak auf. Rubiporphyrin gibt im Phosphorpentoxydexsiccator unter gewöhnlichem Druck langsam alles Ammoniak wieder ab, im Vakuum der Wasserstrahlpumpe schon in einem Tage. Auch Erythroporphyrin verliert im evakuierten Exsiccator schnell die 2 Mole NH_3, hingegen läßt Rhodoporphyrin im gewöhnlichen Vakuum nur 1 NH_3 abdissoziieren und das zweite erst im Hochvakuum äußerst langsam.

Absorptionsspektra[2]).

Die Beschreibung und Darstellung der Absorptionsspektra geschieht ebenso wie beispielsweise im Kap. VI und in den Tafeln VI und VII. Ganz schwache Schatten (|) wurden bei den nachfolgenden Verbindungen nicht berücksichtigt. Die Messungen wurden mit einem Prismenspektroskop ausgeführt, in der Zeichnung (Fig. 15) aber sind die Abstände der einzelnen Wellenlängen gleich gemacht worden, so wie sie im Gitterspektroskop erscheinen. Die graphisch

[1]) Abh. XXII; siehe auch z. B. Ann. d. Chem. 382, 174 u. 179 [1911]; Ann. d. Chem. 387, 366 und f. [1911].

[2]) Abh. V und VIII.

dargestellten Spektren von umkrystallisiertem Glaukophyllin und von Rhodophyllin sind in alkoholischer, alle anderen in ätherischer Lösung gemessen worden.

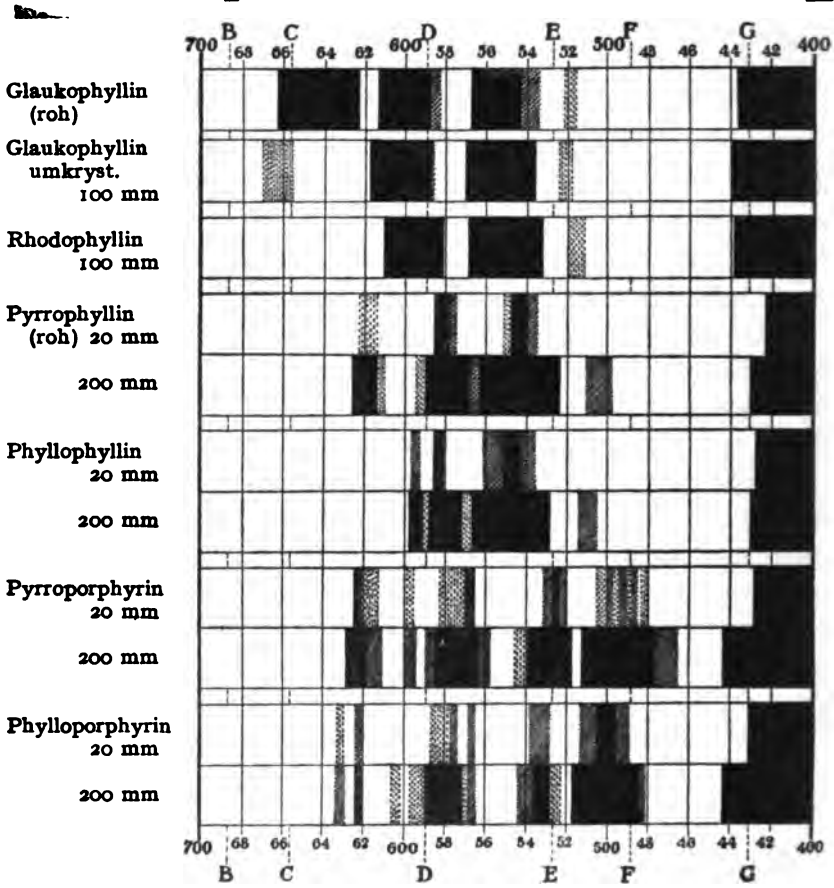


Fig. 15.

Glaukophyllin.

Aus rohem, frisch isoliertem Kaliumsalz wurde eine ätherische Lösung der Carbonsäure von unbekannter Konzentration bereitet.

Das Absorptionsspektrum zeigt einen sehr großen Unterschied im Vergleich zur umkrystallisierten Substanz. Der Streifen I ist viel intensiver, er ist der stärkste; er ist sehr scharf und so breit,

daß er weit in das Orange hineinreicht. Noch in äußerst verdünnter Lösung ist er gut wahrnehmbar. Diese Absorption im Rot ist der Hauptunterschied von Rhodophyllin.

Schicht in mm	2,5	10	40
Band I	652— —633	655—630	662,5—622,5
„ II	605...594,5	607,5—594,5	613—587— —582
„ III	559·551	561— —549	547—542— —536
„ IV	—	—	521..516
Endabsorption	—	434—	437—

Reihenfolge nach der Intensität: I, II, III, IV.

Die umkrystallisierte Substanz steht in dem Absorptionsspektrum namentlich bei geringer Schichtdicke dem Rhodophyllin viel näher als rohem Glaukophyllin; doch unterscheidet sich umkrystallisiertes Glaukophyllin von Rhodophyllin in stärkerer Schicht im Auftreten des neuen Absorptionsstreifens im Rot bei der Linie C. Außerdem ist das Band IV im Grün schwächer als Band III des Rhodophyllins.

0,1 g umkrystallisiertes Glaukophyllin in 5 l Alkokol.

Schicht in mm	5	20	100
Band I	—	—	670...655
„ II	605...597	610—597...594,5	617—587— —585
„ III	557..551	563— —549	570—536
„ IV	—	—	523,5..517,5
Endabsorption	430,5—	435—	440—

Reihenfolge nach der Intensität: II, III, I, IV.

Rhodophyllin.

Das Absorptionsspektrum dieses Phyllins ist einfach und erinnert sehr an Hämin; es besteht in der sichtbaren Region des Spektrums aus zwei scharf begrenzten starken Bändern im Orange bis Gelb und im Grün, denen noch ein sehr viel schwächeres Band im Grün und eine starke Endabsorption im Violett folgt. Der Hauptunterschied vom Hämin besteht darin, daß das Band des Hämins im Orange nach rechts gerückt ist und fast das ganze Gelb umfaßt.

0,1 g Rhodophyllin in 5 l Alkohol.

Schicht in mm	2,5	20	100
Band I	602...596	605—592..588	610—581
„ II	554·553	562—545	568—532
„ III	—	—	520.512
Endabsorption	424—	431—	438—

Reihenfolge nach der Intensität: I, II, III.

Pyrrophyllin

läßt zum Unterschied von Rhodophyllin sehr viel Licht im Orange durch. Das charakteristische Orangeband des Rhodophyllins erscheint bei geringer Schichtdicke gänzlich ins Gelb gerückt als ein sehr scharfer, schmaler Streifen. Breiter und weniger scharf ist das nachfolgende Band in der grünen Region, das dem Band II von Rhodophyllin sehr ähnlich ist.

Erst in starker Schicht tritt ein schwacher, schmaler Absorptionsstreifen (I) auf und zwar weiter gegen Rot hin als bei Rhodophyllin. Das Orangeband des letzteren ist dann in zwei Streifen gespalten, in den nach links verschobenen schwachen und den intensiven, das Gelb umfassenden Streifen II.

Pyrrophyllin erleidet ähnlich wie Glaukophyllin beim Umkrystallisieren eine Veränderung; umkrystallisiertes Phyllin läßt mehr rotes Licht durch als Rohprodukt, der Absorptionsstreifen I im Rot tritt sehr zurück.

Pyrrophyllin aus 0,1 g Kaliumsalz frisch isoliert in 5 l Äther.

Schicht in mm	20	100
Band I	622,5..614	624——613
„ II	585—578——574	587—571,5
„ III	551...548—540——534,5	561——556—526,5
„ IV	—	509..498
Endabsorption	422,5—	425—

Reihenfolge nach der Intensität: II, III, I, IV.

0,1 g umkrystallisiertes Pyrrophyllin in 5 l Alkohol.

Schicht in mm	10	100	200
Band I	—	—	621..618
„ II	584—579——572	587—569,5	589—567...561
„ III	545——538	559——555—	561—522
		528——526	
„ IV	—	508...498	509...496.490
Endabsorption	421—	424—	427,5—

Reihenfolge nach der Intensität: II, III, IV, I.

Phyllophyllin.

Die ätherische Phyllophyllinlösung wurde aus umkrystallisiertem, reinem Calciumsalz durch vorsichtiges Ansäuern frisch bereitet.

Die Absorption vor der Fraunhoferschen Linie G besteht aus 5 Bändern: I ist im Orange, II, das intensivste, im Gelb, III und IV im Grün; diesen folgt ein sehr viel schwächeres Band im Blau. Das III. und IV. Band entsprechen dem Band II und III des Rhodophyllins. Das I. Band des Rhodophyllins im Orange ist in zwei scharfe, schmale Streifen gespalten, von denen der zweite (kurz nach der Natriumlinie stehend) sehr dunkel ist. Im Grün, neben der E-Linie, wird noch bei höherer Konzentration Licht durchgelassen als bei Rhodophyllin.

Vom frisch isolierten Pyrrophyllin unterscheidet sich Phyllophyllin dadurch, daß bei ihm Band I viel mehr gegen Gelb hin gerückt und daß der Streifen II schmaler ist.

Schon bei kurzem Stehen der Phyllophyllinlösung verrät sich die beginnende Zersetzung an dem Auftreten des charakteristischen Doppelstreifens von Phylloporphyrin bei $\lambda = 633—627$ und 625 bis 618.

0,1 g in 5 l Äther.

Schicht in mm	5	100	500
Band I	595...592	596——591,5	
„ II	584,5——581	586—580..572	602—525...519
„ III	561...542..539	563—534.529	
„ IV	—	514.506	519—497
„ V	—	—	484,5..475
Endabsorption	425—	429,5—	435—

Pyrroporphyrin und Phylloporphyrin.

Die Absorptionsspektra der beiden Porphyrine bestehen, abgesehen von der Endabsorption, aus 6 Bändern, die im Orange, im Grün und im Blau als Absorptionsmaxima hervortreten.

Von der Phylloverbindung unterscheidet sich Pyrroporphyrin dadurch, daß bei ihm Band I gegen das rote Ende verschoben und viel schwächer ist. Ferner sind bei Pyrroporphyrin Band II und III intensiver, ersteres am gleichen Orte, letzteres gegen Violett verschoben. Die getrennten Absorptionsstreifen IV und V des Phylloporphyrins sind zu einem einzigen Band (IV) bei Pyrroporphyrin vereinigt, derart, daß es auf der linken Seite von einem Schatten begleitet wird. Band V und VI von Pyrroporphyrin sind mehr gegen Violett gerückt als die entsprechenden Bänder des Phylloporphyrins, und das Band VI ist komplizierter gegliedert als das korrespondierende Band VII von Phylloporphyrin. Es ist deutlich gerippt, so daß sich drei dunkle Streifen herausheben.

0,1 g Pyrroporphyrin in 5 l Äther.

Schicht in mm	20	500
Band I	—	652.648,5
„ II	624—621.613	636..630—609..600,5
„ III	599..594,5	600,5—594...590
„ IV	583...574..570—565	590—556
„ V	531,5— —526,5—523,5...520,5	547..541—
„ VI	505...499,5— —497...494— —	
	490,5...488,5— —485,5...481	
Endabsorption	428—	

0,1 g Phylloporphyrin in 5 l Äther.

Schicht in mm	20	200
Band I	633..630	633,5— —629,5
„ II	624— —620,5	624—620
„ III	—	606..602
„ IV	587..577— —574	597,5...589,5—572..569
„ V	568,5...565,5	569— —565
„ VI	538...528	543,5— —536—528...523,5
„ VII	513— —505	517—484...481,5
	505—496...489	
Endabsorption	430,5—	443,5—

XXI. Oxydation der Chlorophyllderivate[1]).

William Küster[2]) hat in seinen gründlichen Arbeiten über den Blutfarbstoff die Oxydation des Hämins untersucht. Sie führt zum Imid $C_8H_9O_4N$ der dreibasischen Hämatinsäure:

$$\begin{array}{l} \qquad\qquad\quad CH_3—C—COOH \\ HO_2C—CH_2—CH_2—\overset{\|}{C}—COOH \end{array}$$

Über die Oxydation von Chlorophyll enthielt die Literatur nur eine einzige Angabe. L. Marchlewski[3]) hat Phylloporphyrin mit Chromsäure nach der Methode von Küster oxydiert und daraus die Hämatinsäure in ihrer stickstofffreien Form ($C_8H_8O_5$) erhalten. Dieses Ergebnis schien für die Verwandtschaft der basischen Spaltungsprodukte des Chlorophylls mit dem Hämin zu sprechen.

Es hat sich indessen nicht bestätigt, daß sich das Chlorophyll bei der Oxydation gleich dem Hämin verhält. Das Unterscheidende hat eine Untersuchung von Willstätter und Asahina ermittelt, die mit einer Reihe von Chlorophyllderivaten und mit verschiedenen Oxydationsmethoden ausgeführt worden ist.

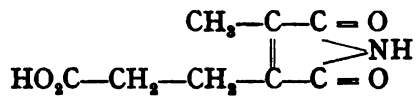
Die Ausgangsmaterialien waren namentlich Phylloporphyrin, Pyrroporphyrin, Rhodoporphyrin und Phytochlorin. In allen Fällen hat die Oxydation das Gleiche ergeben. Wenn man Bleisuperoxyd und Schwefelsäure, Chromsäure oder Carosche Säure

[1]) Abh. IX.

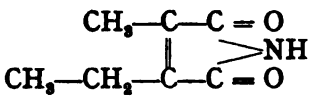
[2]) Beiträge zur Kenntnis des Hämatins, Tübingen 1896. Zeitschr. f. physiol. Chem. **28**, 1 [1899]; **29**, 185 [1900]; **44**, 391 [1905]; **54**, 501 [1908]; **61**, 164 [1909]. Ann. d. Chem. **315**, 174 [1900]. Siehe auch W. Küster, Das Hämatin und seine Abbauprodukte in Abderhaldens Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden, Bd. II, S. 628 [1910].

[3]) Bull. de l'Acad. des Sciences de Cracovie 1902, 1.

einwirken läßt, so führt die Oxydation zu einem Gemisch, das, von kleinen Spaltungsstücken des Moleküls wie Essigsäure und Kohlensäure abgesehen, aus zwei Hauptprodukten besteht, nämlich aus Hämatinsäure, die stets als Imid von der Formel



auftritt, und aus dem Methyläthylmaleinimid:



Dieses Maleinimid hat Küster zuerst durch Abspaltung von Kohlensäure aus dem Imid der Hämatinsäure erhalten und dann synthetisch dargestellt[1]); bei der Oxydation von Hämin trat es nie auf.

Die Oxydation der Chlorophyllderivate erfolgt am glattesten durch Chromsäure. Küster oxydiert Hämatin in warmer essigsaurer Lösung. Es ist viel zweckmäßiger, die Chromsäure in stark schwefelsaurer Lösung bei tiefer Temperatur einwirken zu lassen; auch beim Hämin verdient dieses Verfahren den Vorzug. Dabei läßt sich nämlich Hämin selbst anwenden, man spart die Isolierung des Hämatins und das langwierige Verjagen der Essigsäure, das Küster vorschreibt. Das Oxydationsprodukt, dessen Isolierung sich sehr einfach gestaltet, verliert kein Ammoniak und zeichnet sich durch seine Reinheit aus.

Für unsere Kenntnis von der Struktur der angeführten Verbindungen sind die Ausbeuten an ihren Oxydationsprodukten wichtig. Küster nahm auf Grund seiner zahlreichen Bestimmungen der Ausbeute von Hämatinsäure an, daß drei oder vielleicht sogar vier Moleküle Hämatinsäure aus ebenso vielen Pyrrolkernen des Hämins gebildet werden. Nach Küster liefert nämlich

Hämatoporphyrin: Hämatinsäure roh 60,5, rein 58%; ber. f. 2 Mole 61,2%,

Hämin: Hämatinsäure roh 70, rein 60%; ber. f. 2 Mole 56,2%.

---

[1]) Ann. d. Chem. 345, 1 [1905].

Hingegen hat O. Piloty[1]) aus seiner schönen Arbeit über die Reduktion von Hämin gefolgert, daß nur 2 Moleküle Hämatinsäure entstehen, indem sie aus der von ihm entdeckten Hämopyrrolcarbonsäure hervorgehen.

Die Versuche von Willstätter und Asahina, die allerdings hinsichtlich des zum Vergleiche betrachteten Hämins nur eine Ergänzung zu dem umfassenden Versuchsmaterial von Küster bieten, sprachen zugunsten der Auffassung von Piloty. Die Ausbeute an roher Hämatinsäure ist durch Beimischungen gesteigert; bei der Reinigung gehen die Ausbeuten so zurück, daß sie die Theorie für 2 Moleküle nicht mehr erreichen.

Die Porphyrine aus Chlorophyll liefern annähernd 1 Molekül Hämatinsäure. Dagegen beträgt die Ausbeute an Methyläthylmaleinimid wahrscheinlich mehr als 1 Molekül; bei Einrechnung der Isolierungsverluste sogar gegen $1^1/_2$ Molekül, so daß wir die Bildung des Maleinimides aus 2 Pyrrolkernen anzunehmen haben.

Demnach erstreckt sich der Unterschied zwischen den Porphyrinen aus Chlorophyll und aus Hämin auf mindestens zwei von ihren vier Pyrrolkernen.

Oxydation von Phylloporphyrin mit Bleisuperoxyd.

Es ist vorteilhaft, die Oxydation mit kleinen Portionen auszuführen.

Man löst 1 g Phylloporphyrin in 20 ccm 50 proz. Schwefelsäure und verdünnt mit 30 ccm Wasser. Unter Kühlung mit Eis und Rühren mit der Turbine werden 20 g Bleisuperoxyd in kleinen Portionen im Laufe einer halben Stunde eingetragen. Die Flüssigkeit entfärbt sich, noch ehe alles Oxydationsmittel zugefügt ist; wir setzen das Rühren noch eine Stunde lang fort und lassen über Nacht im Eisschrank stehen. Dann wird der Bleischlamm abgesaugt und mit Wasser (50 ccm) nachgewaschen. Das gelbliche Filtrat mit dem Waschwasser äthert man erschöpfend aus und trocknet die ätherische Lösung. Sie hinterläßt beim Eindampfen einen bräunlichen Syrup.

[1]) Ann. d. Chem. 366, 237 [1909].

An rohem Oxydationsprodukt erhielten wir 8,4 g aus 20 g Phylloporphyrin, die zum Teil in größeren Portionen verarbeitet waren; bei einer Reihe von Versuchen mit je 1 g betrug die Ausbeute die Hälfte vom Porphyrin.

Das Oxydationsprodukt besteht aus einem neutralen und einem sauren Anteil. Zur Trennung vereinigten wir die Ausbeute von 5 Versuchen und nahmen sie mit wenig Wasser auf; dabei hinterblieb eine kleine Menge von unlöslichem, fettigem Produkt. Das Filtrat wurde mit Soda schwach alkalisch gemacht und mit Äther extrahiert. Beim Abdampfen der Ätherlösung blieb ein fast farbloses, drusig-krystallinisches Produkt zurück; infolge seiner Flüchtigkeit bei Wasserbadtemperatur sublimierten mitunter lange Nadeln in den Kolbenhals.

Die sodaalkalische Mutterlauge säuerten wir an und sättigten sie mit Ammonsulfat; durch Ausäthern isolierten wir die Säure, die schon im unreinen Zustand charakteristische Rosetten von feinen Nädelchen bildete.

Diese Trennung ergab 3,3 g indifferentes und etwas über 2 g saures Oxydationsprodukt.

Die neutrale Substanz wird durch zweimaliges Umkrystallisieren aus Wasser, worin sie warm ziemlich leicht, kalt schwer löslich ist, vollkommen gereinigt. In den organischen Solvenzien, außer in Petroleumkohlenwasserstoffen, löst sie sich sehr leicht. Sie stimmt mit dem Schmelzpunkt 67—68°, mit ihrem schwachen jodoformähnlichen Geruch, dem anfangs süßen, dann bitteren Geschmack und in ihren übrigen Merkmalen genau mit der Beschreibung des Methyläthylmaleinimids von Küster überein.

Das saure Oxydationsprodukt des Phylloporphyrins erweist sich als identisch mit der eigentlichen Hämatinsäure, also dem „Imid der dreibasischen Hämatinsäure" von der Formel $C_8H_9O_4N$, das Küster entdeckt und sorgfältig gekennzeichnet hat. Die Säure war im Wasser und in den Alkoholen sehr leicht löslich; einmal aus Essigester, sodann aus Äther-Benzolmischung umkrystallisiert, lag sie hinreichend rein vor in sternförmig gruppierten harten Nadeln. Den Schmelzpunkt fanden wir, etwas abhängig von der Art des Erhitzens, bei 112—113°.

Oxydation von Phylloporphyrin mit Chromsäure-Schwefelsäure in der Kälte.

5 g Phylloporphyrin werden unter Anrühren in der Reibschale mit 70—90 ccm 50 proz. Schwefelsäure in Lösung gebracht und diese mit 30—50 ccm Wasser verdünnt. In die tiefrote Lösung läßt man nach dem Abkühlen auf 0° unter Rühren mit der Turbine die Chromsäure (13 g in 50 ccm Wasser) durch den Frankensteinschen Rührer eintropfen und hält dabei die Temperatur auf höchstens 5—7°. Das Eintragen erfordert eine Stunde; ohne erheblich zu schäumen, färbt sich die Flüssigkeit dunkelweinrot und dann olivgrün. Man setzt das Rühren noch eine Stunde fort und filtriert erst am nächsten Tage die inzwischen rein grün gewordene Flüssigkeit von ein wenig ungelöster rotbrauner Substanz (höchstens 0,2 g) ab, die sich der Oxydation entzogen hat. Dann extrahieren wir das Filtrat, ohne es zu verdünnen, erschöpfend mit Äther. Die mit Natriumsulfat getrocknete ätherische Lösung hinterläßt beim Abdampfen das Gemisch der beiden Oxydationsprodukte als schwach gelblichen Sirup, der im Vakuum über Natronkalk langsam den Geruch nach Essigsäure verliert.

Das Gemisch krystallisiert nicht, aber wenn man es durch Auflösen in Wasser, Neutralisieren und Ausäthern zunächst der sodaalkalischen, sodann der angesäuerten und mit Ammonsulfat gesättigten Lösung in seine beiden Komponenten zerlegt, so krystallisieren beide sogleich.

Bei Versuchen mit je 5 g Phylloporphyrin, das durch Fraktionierung mit Salzsäure gereinigt und überdies für den Versuch III aus Äther umkrystallisiert war, erzielten wir folgende Ausbeuten:

	Rohes Gemisch	$C_7H_9O_2N$	$C_8H_9O_4N$
Gefunden I.	3,55	1,35	1,00
„ II.	3,30	1,67	1,31
„ III.	3,00	1,20	1,10
Theor. Ausbeute von je 1 Mol.	3,18	1,37	1,81

Um die Genauigkeit unserer Ausbeutebestimmung und die unvermeidlichen Verluste bei der Trennung kennen zu lernen, haben wir

1. gewogene Mengen von Imid, sowie von Hämatinsäure in 100 ccm 35 proz. Schwefelsäure gelöst und genau nach der Art

unserer Isolierung des rohen Oxydationsproduktes zurückgewonnen.

Angewandt 0,890 g Imid, gef. 0,842 g (94,7%).

Angewandt 1,000 g Hämatinsäure, gef. 0,897 g (89,7%).

2. Es wurden die beiden reinen Oxydationsprodukte vermischt und nach der beschriebenen Methode getrennt.

Angewandt 1,365 g $C_7H_9O_2N$ + 1,386 g $C_8H_9O_4N$, gef. 1,278 d. i. 93,6% Imid und 1,387 d. i. 100,0% Hämatinsäure.

Da wir hier reinen Äther (nicht von der Isolierung des Imids wiedergewonnenen und daher imidhaltigen) anwandten, ging etwas Imid durch Verflüchtigung mit Ätherdampf verloren.

Wenn man die hier ermittelten Verluste bei der zweimaligen Isolierung zur Ausbeute des Versuches II hinzurechnet, so ergeben sich die folgenden Schätzungen für die beiden Oxydationsprodukte:

Imid	38%	statt 27%	= 1 Mol.
Hämatinsäure	28%	statt 36%	= 1 Mol.

Pyrroporphyrin und Rhodoporphyrin gaben bei der Oxydation dasselbe Resultat wie Phylloporphyrin.

Oxydation von Hämin.

Mit Bleisuperoxyd. Hämin wurde in Portionen von 1 g in 15 g konzentrierter Schwefelsäure unter Anrühren in der Reibschale gelöst; die Flüssigkeit trugen wir unter Eiskühlung und Rühren in die Suspension von 15 g Bleisuperoxyd in 60 g 50proz. Schwefelsäure tropfenweise ein. Die Oxydation wurde wie bei Phylloporphyrin zu Ende geführt; sie ergab 2,1 g krystallisiertes Rohprodukt aus 5 g Hämin und nach der Reinigung mit Sodalösung, wobei eine kleine Menge nicht krystallisierbarer, wachsartiger Substanz ungelöst blieb, 1,8 g ziemlich reine Hämatinsäure.

Mit Chromsäure-Schwefelsäure erhalten wir die Hämatinsäure reiner als durch Oxydation in warmem Eisessig nach Küster und die Ausbeute an Rohprodukt niedriger, vielleicht eben infolge des Fehlens von Beimischungen.

5 g Hämin werden mit 25 g konzentrierter Schwefelsäure verrührt und mit 50 ccm 50proz. Schwefelsäure verdünnt. Wir kühlen

die trübe dunkelbraune Flüssigkeit mit Eis und tragen unter Rühren tropfenweise die wäßrige Chromsäure ein (15 g in 50 ccm); die Temperatur wird während der zum Eintragen erforderlichen Stunde auf 5—7° gehalten. Die Farbe schlägt in Olivgrün um und wird beim Stehen in einigen Stunden rein grün; die abzufiltrierende Ausscheidung ist nur etwa 0,25 g.

Die Ausbeute an rohem Imid der dreibasischen Hämatinsäure betrug bei wiederholten Versuchen 2,34 g; bei der Reinigung (nach dem Verfahren von Küster) genügte es, $^1/_{15}$ der zur Salzbildung erforderlichen Menge Calciumcarbonat anzuwenden. Die wieder isolierte reine Hämatinsäure belief sich auf 1,56 g.

XXII. Reduktion der Chlorophyllderivate[1]).

1. Zur Geschichte.

Bei der Reduktion von Hämin mit Jodwasserstoff und Phosphoniumjodid haben M. Nencki und J. Zaleski[2]) das Hämopyrrol entdeckt. Sie haben die Formel $C_8H_{13}N$ für die Base aus der Analyse des krystallisierten Pikrats und der amorphen Verbindung mit Quecksilberchlorid abgeleitet. Wie die Beziehungen zwischen dem Hämatoporphyrin und dem Phylloporphyrin von Hoppe-Seyler und E. Schunck erwarten ließen, ist es auch gelungen, das Hämopyrrol aus einem Chlorophyllderivat abzuspalten. Nencki hat nämlich gemeinsam mit L. Marchlewski[3]) bei der Reduktion von sogenanntem Phyllocyaninkupferacetat die Bildung von Hämopyrrol beobachtet und die Base als Quecksilberverbindung analysiert.

Wenige Monate nach der Publikation seiner Entdeckung starb Nencki. Und seitdem ist das Hämopyrrol, so leicht zugänglich es ist nach dem Verfahren von Nencki und Zaleski, und so wichtig für die Kenntnis von Blut- und Blattfarbstoff, bis vor kurzem nur unzureichend untersucht worden.

Über die Natur der Seitenketten im Hämopyrrol haben allerdings die Untersuchungen von W. Küster Aufschluß gegeben. Hatten Nencki und Zaleski von einer Butyl- oder Propylgruppe gesprochen, so machte es W. Küster[4]) durch die Oxydation zum Methyläthylmaleinimid sehr wahrscheinlich, daß das

---

[1]) Abh. XVIII.
[2]) Ber. d. d. chem. Ges. 34, 997 [1901].
[3]) Ber. d. d. chem. Ges. 34, 1687 [1901].
[4]) Ann. d. Chem. 346, 1 [1906] u. Zeitschr. f. physiol. Chem. 55, 526 [1908].

Hämopyrrol ein α-Methyl-β, β-methyläthylpyrrol ist. Überdies hat Küster gezeigt, daß das Hämopyrrol aus einem anderen Kern des Hämins hervorgeht als die Hämatinsäure; denn seine Bildung erfolgt ohne Abspaltung von Kohlendioxyd.

Das Hämopyrrol ist nach Küster nicht einheitlich. Mit Mineralsäuren trennte Küster das Gemisch in eine saure und eine basische Fraktion. Die erstere enthielt das Pyrrol, die letztere wahrscheinlich das entsprechende Pyrrolin.

In einer eingehenden Untersuchung ist dann O. Piloty[1]) daran gegangen, Hämopyrrol in reinem Zustand darzustellen. Er führte die Reduktion mit Zinn und Salzsäure aus. Das Pyrrol versuchte er von hydrierten Basen durch fraktionierte Destillation im Vakuum zu trennen. Sein Hämopyrrol krystallisiert teilweise, der Schmelzpunkt liegt bei 39°; das Pikrat hat stets den Schmelzpunkt 108,5°. Den Konstitutionsbeweis von Küster vervollständigt Piloty, indem er das Hämopyrrol mit salpetriger Säure zum Oxim des Methyläthylmaleinimids oxydiert (Schmelzpunkt 201°).

Um die Produkte der Spaltung von Chlorophyll und Hämin durch Reduktion zu vergleichen, haben Willstätter und Asahina eine Untersuchung ausgeführt, mit dem Ergebnis, daß das Hämopyrrol aus Chlorophyll und Hämin übereinstimmt, daß es aber nicht, wie bis dahin allgemein angenommen worden war, ein einheitliches Pyrrol ist, sondern ein kompliziertes Gemisch von Pyrrolhomologen.

Die beigemischten hydrierten Pyrrolbasen, sekundäre Produkte der Reduktion, ließen sich leicht und quantitativ durch Ausschütteln mit Mononatriumphosphat abtrennen. Es fehlte aber an Mitteln, um das so gereinigte Hämopyrrol in seine Bestandteile aufzulösen. Die fraktionierte Destillation im Vakuum bot dafür keine Aussicht. Es wurde versucht, durch fraktionierte Krystallisation der Pikrate eine Trennung zu erzielen, aber ohne guten Erfolg. Hingegen haben Willstätter und Asahina eine gute Methode in der fraktionierten Salzbildung mit Pikrin-

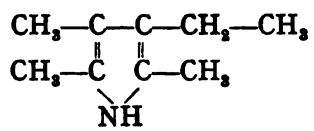
[1]) Ann. d. Chem. 366, 237 [1909]; 377, 314 [1910]; O. Piloty u. E. Quitmann, Ber. d. d. chem. Ges. 42, 4693 [1909].

säure gefunden und durch mehrmalige Anwendung des Verfahrens drei Komponenten des Hämopyrrols isoliert. Zwei von denselben waren rein (Isohämopyrrol und Phyllopyrrol), eine dritte (Hämopyrrol) hat sich weiterhin als noch nicht einheitlich erwiesen.

Ein Bestandteil des Hämopyrrolgemisches entsprach annähernd und am ehesten den bekannten Angaben: Schmelzpunkt des Pikrates 108—109°, des durch Einwirkung von salpetriger Säure entstehenden Methyläthylmaleinimidoxims 201°; für diese Komponente wurde deshalb der Name Hämopyrrol beibehalten.

Eine zweite Base, deren Pikrat bei 119° schmolz, wurde in reinem, krystallisiertem Zustand (bei 16—17° schmelzend) erhalten; gegen salpetrige Säure verhielt sie sich wie Hämopyrrol, sie gab das zweite Oxim des Methyläthylmaleinimids (Schmelzpunkt 219°). Für diese neue Komponente haben Willstätter und Asahina den Namen Isohämopyrrol eingeführt, während H. Fischer und E. Bartholomäus[1]) sie um dieselbe Zeit isolierten und Hämopyrrol nannten.

Am wichtigsten war die Auffindung einer anders zusammengesetzten dritten Komponente, des Phyllopyrrols von Willstätter und Asahina, dem alle besonderen Kennzeichen des Hämopyrrols fehlten. Es enthielt ein Kohlenstoffatom mehr und wurde als Trimethyläthylpyrrol erklärt, entsprechend der Formel:



Auch diese Komponente haben zu gleicher Zeit H. Fischer und E. Bartholomäus beobachtet.

Das Salz des Phyllopyrrols mit Pikrinsäure wird schwerer erhalten, es ist von den Pikraten das leichtest lösliche. Die Oxydation mit Chromsäure, die Reaktion mit salpetriger Säure verläuft nicht glatt, das Imid der Methyläthylmaleinsäure ist nicht erhalten worden. Von den Pyrrolbasen mit 8 Kohlenstoffatomen

[1]) Ber. d. d. chem. Ges. 44, 3313 [1911].

unterscheidet sich das Phyllopyrrol vor allem durch das Ausbleiben der Fichtenspanreaktion und der von P. Ehrlich[1]) aufgefundenen und von O. Neubauer[2]) aufgeklärten Farbreaktion mit Dimethylaminobenzaldehyd. Auch wird es in saurer Lösung durch Diazoniumsalz nicht gefällt.

Dennoch kann die Base nichts anderes sein, als ein Pyrrol. Denn sie nahm bei der Reduktion vier Atome Wasserstoff auf und lieferte ein gesättigtes Hydroderivat. Dasselbe war — ungeachtet aller Verschiedenheit der zugrundeliegenden Pyrrole — äußerst ähnlich den zum Vergleich dargestellten Hämopyrrolidinen. Wäre die krystallisierte Base ein Hexahydromethylindol, so könnte sie nur zwei Atome Wasserstoff addieren.

Die Unterschiede zwischen Hämo- und Phyllopyrrol erklären sich dadurch, daß im letzteren alle vier Kohlenstoffatome Seitenketten tragen.

Die Fichtenspanreaktion ist analog der Dimethylaminobenzaldehydreaktion als eine Kondensation von Aldehyden des Holzes mit den Pyrrolkernen zu verstehen. F. Feist[3]) hat gezeigt, daß die am Kohlenstoff tetrasubstituierten Pyrrole sich nicht mit Aldehyden zu kondensieren vermögen, und H. Fischer[4]) hat bemerkt, daß die an den vier Kohlenstoffatomen substituierten Pyrrole die Ehrlichsche Reaktion nicht erfüllen.

Noch einen besonders interessanten Unterschied weist Pyllopyrrol gegenüber dem Hämopyrrol und gegenüber den Angaben der Literatur auf. Es wird von wässeriger Quecksilberchloridlösung nicht gefällt, es ist also bei der Abscheidung des Hämopyrrols nach Nencki und Zaleski[5]) stets in der Mutterlauge geblieben.

Die trisubstituierten Pyrrole werden von Quecksilberchlorid gefällt, das tetrasubstituierte nicht. Demnach ist die Reaktion der Pyrrole mit dem Quecksilberchlorid nicht, wie man angenommen hat, eine Salzbildung am Stickstoff (mit Kalium gibt Phyllopyrrol natürlich ein Salz), sondern wahrscheinlich eine Mercurierung am

[1]) Die medizinische Woche 1901, 151.
[2]) Verhandlg. d. Ges. d. Naturf. u. Ärzte 1903, II. Teil, 2. Hälfte, 68.
[3]) Ber. d. d. chem. Ges. 35, 1647 [1902].
[4]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 73, 204 [1911].
[5]) Ber. d. d. chem. Ges. 34, 1003 [1901].

Kohlenstoff, wie sie zuerst beim Tiophen von J. Volhard[1]), bei vielen aromatischen Verbindungen von O. Dimroth[2]) und anderen Forschern beobachtet worden ist.

Das Gemisch der verschiedenen Pyrrole entsteht immer bei der Reduktion von Derivaten des Chlorophylls mit Jodwasserstoff und Phosphoniumjodid oder mit Zinn und Salzsäure, sowie bei der Reduktion des Hämins nach Nencki und Zaleski oder von Hämatoporphyrin nach Piloty, also auch da, wo nur auf zwei Kerne des Farbstoffmoleküls oder vielleicht sogar nur auf einen einzigen die Bildung flüchtiger Basen zurückzuführen ist.

Von den untersuchten Chlorophyllderivaten hat Phylloporphyrin die größte Ausbeute an flüchtigem Reduktionsprodukt geliefert, weil es nur eine Carboxylgruppe enthält. Von der Rolle der vier stickstoffhaltigen Kerne des Phylloporphyrins bei der Oxydation und der Reduktion mag man sich folgende Vorstellung bilden: Zwei Kerne liefern bei der Reduktion die trisubstituierten Pyrrole. Es sind die nämlichen, aus denen bei der Oxydation das Methyläthylmaleinimid hervorgeht. Ein Kern tritt nach der Reduktion als Phyllopyrrol auf; es ist wahrscheinlich derselbe, der bei der Oxydation verloren geht. Der vierte Kern behält bei der Reduktion wie bei der Oxydation sein Carboxyl; er bildet also kein flüssiges Pyrrolderivat; sein Oxydationsprodukt ist das Imid der Hämatinsäure.

Mit diesen Ergebnissen war die Aufklärung des Hämopyrrols nicht vollendet; die Fortsetzung der Untersuchung von Willstätter und Asahina ist aber durch rasche Veröffentlichungen anderer Forscher überholt worden.

Schon um die gleiche Zeit haben L. Knorr und K. Hess[3]) die Synthese des 2,4-Dimethyl-3-äthyl-pyrrols ausgeführt und seine Verschiedenheit von den bei der Reduktion des Hämins erhaltenen Pyrrolen festgestellt. Dieses Pyrrolhomologe ist kurz

---

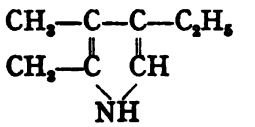
[1]) Ann. d. Chem. 267, 172 [1891].

[2]) Ber. d. d. chem. Ges. 31, 2154 [1898]; 32, 758 [1899]; 35, 2032, 2853 [1902].

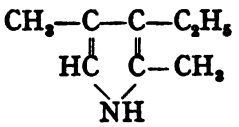
[3]) Ber. d. d. chem. Ges. 44, 2758 [1911]; 45, 2526; vgl. R. Willstätter und Y. Asahina, Ber. d. d. chem. Ges. 44, 3707 [1911].

nachher von H. Fischer und E. Bartholomäus[1]) als Bestandteil des Hämopyrrols aufgefunden und Kryptopyrrol genannt worden.

Die drei Basen Phyllopyrrol, Isohämopyrrol (nach der Bezeichnung von Fischer Hämopyrrol) und Kryptopyrrol,

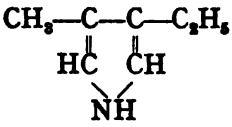


Iso-Hämopyrrol

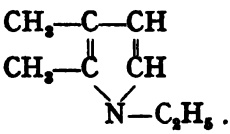


Kryptopyrrol

unter denen Isohämopyrrol quantitativ überwiegt, sind die hauptsächlichen, aber nicht die einzigen Bestandteile des Gemisches. O. Piloty und J. Stock[2]) haben bedeutende Mengen von Hämopyrrolgemisch nach der Methode von Willstätter und Asahina fraktioniert und daraus noch folgende Bestandteile isoliert:



Hämopyrrol a d. i. 3,4-Methyläthylpyrrol



Hämopyrrol e d. i. 1-Äthyl-2-3-dimethylpyrrol,

nur in Form eines bimeren Derivates erhalten[3]).

Das Hämopyrrol von Willstätter und Asahina (Pikratschmelzpunkt 108—109°) betrachten Piloty und Stock als Gemisch von Isohämopyrrol, Kryptopyrrol und anderen Pyrrolen; freilich ist diese Erklärung sehr unsicher, da es in der Untersuchung von Willstätter und Asahina durchaus nicht gelungen ist, die Base durch fraktionierte Salzbildung mit Pikrinsäure zu zerlegen.

---

[1]) Ber. d. d. chem. Ges. 45, 1979 [1912].

[2]) Ann. d. Chem. 392, 215 [1912]; Ber. d. d. chem. Ges. 46, 1008 [1913].

[3]) Nach O. Piloty und K. Wilke (Ber. d. d. chem. Ges. 46, 1597 [1913] sind die Angaben über Hämopyrrol e zweifelhaft.

Die oben aufgestellte Formel des Phyllopyrrols ist durch elegante Synthesen von H. Fischer und E. Bartholomäus[1]) bewiesen worden. Fischer und Bartholomäus haben nämlich die Entdeckung gemacht, daß Pyrrole durch Erhitzen mit Natriummethylat und Natriumäthylat alkyliert werden. Mit dieser schönen Methode haben sie aus Trimethylpyrrol und aus Dimethyläthylpyrrol das Phyllopyrrol erhalten. Auch U. Colacicchi[2]) hat auf synthetischen Wegen Phyllopyrrol dargestellt.

2. Zerlegung von Hämopyrrol durch fraktionierte Salzbildung mit Pikrinsäure.

Das Beispiel einer Fraktionierung von Hämopyrrol, dargestellt aus Hämin, führen wir wegen des praktischen Wertes der Methode ungefähr mit den Worten von Willstätter und Asahina an, wenn auch die Einheitlichkeit der einen von den drei Komponenten etwas zweifelhaft geworden ist.

Die Spaltung des Hämins durch die Einwirkung von Jodwasserstoffsäure mit Jodphosphonium haben wir im wesentlichen nach den Angaben von Nencki und Zaleski[3]) und zwar mit Portionen von 25—50 g Hämin ausgeführt. Wir erhitzten je 25 g Hämin mit dem Gemisch von 450 ccm Eisessig und 500 g Jodwasserstoffsäure vom spezifischen Gewicht 1,96 zunächst 1½ Stunden lang auf dem Dampfbad; das Hämin ging rasch in Lösung; die Flüssigkeit wurde rotbraun und dann durch das Freiwerden von Jod allmählich tiefbraun. Dann trugen wir unter weiterem Erwärmen nur 20 g Phosphoniumjodid (anstatt 40—50 nach Nencki und Zaleski) in kleinen Portionen während einer halben Stunde ein. Diese Menge reichte zur Aufhellung der Lösung hin, so daß am Ende eine Probe beim Versetzen mit Wasser klar und hellgelb war. Wir verdünnten mit dem 1½fachen Volumen Wasser und trugen calcinierte Soda ein bis zu stark alkalischer Reaktion. Man kann die Pyrrole ausäthern, aber reiner erhält

[1]) Ber. d. d. chem. Ges. 45, 466 [1912]; Zeitschr. f. physiol. Chem. 77, 185 [1912].
[2]) Atti R. Accad. dei Lincei 21, I, 489 und 653 [1912].
[3]) Ber. d. d. chem. Ges. 34, 1002 [1901].

man sie (wenngleich mit einem kleinen Verlust durch Harzbildung) bei der Destillation mit Wasserdampf. Die übergehenden Basen fingen wir in Vorlagen auf, die mit Äther und verdünnter Natronlauge beschickt waren; die Extraktion mit Äther wurde durch Aussalzen vervollständigt.

Für die weitere Aufarbeitung sind die Ätherextrakte aus 300 g Hämin vereinigt worden.

Zur Abtrennung der hydrierten Pyrrolbasen schütteln wir die gesamte Ätherlösung der Basen dreimal mit 30 proz. Mononatriumphosphatlösung aus. Die starken Basen werden quantitativ weggenommen, ohne daß etwas von den Pyrrolen mitgeht. Dann wird die ätherische Lösung mit ein wenig Lauge und mit Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet.

Fraktionierte Salzbildung. Zunächst zerlegen wir das Gemisch durch fraktionierte Pikratbildung in drei noch unreine Hauptfraktionen.

Die Lösung (800 ccm) enthielt 70 g Basen, gegen 80% davon konnten wir in der Form der Pikrate isolieren (155 g). Mit der berechneten Menge Pikrinsäure (etwa 135 g) reicht man nicht aus, da sich namentlich das Pikrat des Phyllopyrrols nur aus überschüssiger ätherischer Pikrinsäure gut ausscheidet. Wir wenden daher 150—160 g Pikrinsäure an und isolieren 10 Fraktionen der Pikrate, die sich zu 3 Hauptfraktionen zusammenfassen lassen.

1. Auf Zusatz von 30 g Pikrinsäure, gelöst in 600 ccm wasserhaltigem Äther, schieden sich rasch 35,0 g Pikrat aus. Prismen vom Schmelzpunkt 116° (unscharf), Schmelzpunkt einer aus Alkohol umkrystallisierten Probe 119°.

2. Das Filtrat von 1. gab mit 10 g Pikrinsäure in 200 ccm feuchtem Äther in einer Stunde 7,0 g von gleichem Pikrat.

3. Das Filtrat wurde wieder mit 10 g gelöster Pikrinsäure vermischt und einige Stunden im Eisschrank aufgestellt. Es gab 19,0 g Pikrat vom Schmelzpunkt 116°, lange und kurze Prismen. Eine umkrystallisierte Probe schmolz bei 119°.

Die drei Abscheidungen (zusammen mit 7a) vereinigten wir zur I. Hauptfraktion (etwa 62 g); sie enthielt hauptsächlich Isohämopyrrol.

4. Das Filtrat liefert mit 10 g gelöster Pikrinsäure wieder 6,5 g Pikrat, Nadeln und Täfelchen vom Schmelzpunkt 108—109°, der sich beim Umkrystallisieren nicht änderte.

5. Nochmals mit der gleichen Menge Pikrinsäure entstand eine weitere Ausscheidung von 12,5 g Pikrat bei 109° schmelzend.

6. Das Filtrat versetzten wir mit der doppelten Menge Pikrinsäure; in $1^1/_2$ Stunden schieden sich 11,0 g Pikrat vom Schmelzpunkt 108—109° aus.

7. Das Filtrat ließen wir mit 15 g Pikrinsäure in 300 ccm Äther im Kälteraum über Nacht stehen; die neue Ausscheidung betrug 9,0 g, sie schmolz bei 108° und bestand aus feinen Nadeln und derben Tafeln. Aus dem Gemisch mechanisch isolierte Tafeln zeigten den Schmelzpunkt 118°. Man sieht, daß die Trennung nicht in einem einmaligen Prozesse gelingt. Nachdem der größte Teil der zweiten Base ausgefällt worden, setzt die Lösung von neuem etwas Isohämopyrrolsalz ab.

Die 7. Fraktion erforderte eine Vorbehandlung, ehe sie rein genug war, mit den anderen Krystallisationen vereinigt zu werden. Wir schüttelten sie mit einem Gemisch von 1 Volum Äther und 2 Volumen Essigester an, bis der ungelöste Teil aus ziemlich einheitlichen derben Prismen bestand. Dann krystallisierten wir die letzteren aus Alkohol um und erhielten so 1,4 g lange Säulen vom Schmelzpunkt 115°: 7a. Die alkoholische Mutterlauge sowie die ätherisch-essigätherische Lösung gaben 6,0 g Pikrat vom Schmelzpunkt 108—109°: 7b.

Die Krystallisationen 4—6 und 7b (36 g) vereinigten wir zur II. Hauptfraktion und verarbeiteten sie durch eine weitere Fraktionierung auf unsere zweite Komponente.

8. Zum Filtrat von 7 fügten wir 20 g Pikrinsäure in 400 ccm Äther. Beim Stehen bei 0° entstand keine Krystallisation mehr. Die Lösung wurde deshalb im Vakuum auf zwei Drittel ihres Volumens eingeengt und dann $1^1/_2$ Stunden mit Eis gekühlt. Nun bildete sich eine Ausscheidung von nur 4 g Pikrat (Schmelzpunkt gegen 94°).

Bei der Prüfung erwies sich dieses Präparat als Gemisch. Wir schüttelten es mit 100 ccm Äther längere Zeit und filtrierten das

Ungelöste ab. Die Lösung lieferte, im Vakuum auf ein kleines Volumen gebracht und mit Pikrinsäure gesättigt, 1 g reines Phyllopyrrolsalz. Den ungelösten Teil krystallisierten wir aus Alkohol um. Zuerst schied sich 1,1 g Pikrat vom Schmelzpunkt 118—119° ab, dann wenig vom Schmelzpunkt 105°, endlich aus der konzentrierten Mutterlauge beim Sättigen mit Pikrinsäure 2,2 g Phyllopyrrolpikrat, mit Pikrinsäure vermischt.

Von Fraktion 8 kamen also etwa 3 g zur III. Hauptfraktion.

9. Das Filtrat dampften wir abermals im Vakuum auf sein halbes Volumen ein, diesmal schieden sich 40,0 g Pikrat aus vom Schmelzpunkt gegen 90° als Mehl von mikroskopischen Prismen. Eine Probe gab mit Natronlauge rasch krystallinisch erstarrende Base.

10. Die Mutterlauge sättigten wir mit 30 g fein gepulverter Pikrinsäure. Beim Stehen über Nacht im Eisschrank schieden sich noch 5 g Pikrat von den Eigenschaften der Fraktion 9 aus.

Die Krystallisationen 8, 9 und 10, die hauptsächlich aus Phyllopyrrolsalz bestanden, gaben die III. Hauptfraktion (etwa 48 g) und wurden einer wiederholten Fraktionierung unterworfen.

11. Das Filtrat der 10. Krystallisation lieferte bei weiterem Konzentrieren im Vakuum nur noch eine kleine Menge von krystallisiertem Prikat. Daher machten wir die Basen daraus frei, extrahierten sie mit Äther und destillierten den Abdampfrückstand derselben von neuem mit Wasserdampf. Dabei ging etwas Öl über, dessen ätherische Lösung mit Pikrinsäure noch eine geringe Abscheidung vom Schmelzpunkt 118° gab und eine weitere Krystallisation (0,5 g), die gegen 90° schmolz. Bei der Dampfdestillation bleiben aber im Kolben 15 g eines braunen Harzes zurück. Aus diesem ließen sich durch Erwärmen mit Jodwasserstoff und Jodphosphonium und weitere Verarbeitung genau wie bei der Reduktion des Hämins wieder Pyrrole gewinnen, wenigstens ein Teil der durch die Verharzung verlorenen Basen.

Isohämopyrrol.

Aus 60 g der I. Hauptfraktion wurde das Pyrrol mit Natronlauge isoliert und im Vakuum destilliert; darauf haben wir es der erneuten Fraktionierung mit Hilfe von Pikrinsäure unterworfen,

die, allerdings mit Verlusten, eine nach allem Anschein völlig homogene Base lieferte.

Die Rohbase ist mit nur $^2/_3$ der theoretisch erforderlichen Menge der Säure als Pikrat gefällt und dieses aus Alkohol umkrystallisiert worden. Aus der alkoholischen Mutterlauge und der Restlösung von der Pikratbildung gewannen wir Base zurück und schieden mit der Hälfte der berechneten Säure nochmals Pikrat ab, das gleichfalls umkrystallisiert worden ist. Das der Rohbase beigemischte Isomere blieb in der Mutterlauge.

Aus dem so gewonnenen reinsten Pikrat ist endlich das Isohämopyrrol frei gemacht und abermals im Vakuum destilliert worden.

Hämopyrrol.

Aus der II. Hauptfraktion der Pikrate haben wir durch weitere drei systematische Anwendungen der fraktionierten Salzbildung ein vollkommen homogenes Präparat isoliert.

Zweite Fraktionierung. Die aus 34,5 g Pikrat frei gemachte Base ist mit einzelnen Zehnteln der zur Sättigung erforderlichen Menge Pikrinsäure vermischt worden.

Die ersten vier Zehntel gaben Fällungen (9,8 g), die einen zu hohen Schmelzpunkt besaßen und sich als Gemische der bei 108 und 119° schmelzenden Pikrate erwiesen. Darauf erhielten wir mit dem fünften Zehntel und dann in einem Male mit der zweiten Hälfte der Pikrinsäure Krystallisationen vom richtigen Schmelzpunkt (20 g). Hieraus ist aufs neue die Base frei gemacht worden.

Dritte Fraktionierung. Diesmal wurde die Pikrinsäure in noch kleineren Anteilen eingetragen, nämlich in Portionen von 20 ccm feuchter ätherischer Lösung = 1 g Säure. Die zwei ersten Niederschläge schmolzen zu hoch, auch der dritte war noch unsicher. Hingegen gab das vierte Gramm Pikrinsäure 1,1 g reines Hämopyrrolpikrat. Darauf wurden 150 ccm Pikrinsäurelösung auf einmal zugefügt und nach dem Abfiltrieren von 7 g Pikrat vom Schmelzpunkt 108° noch eine ebenso reine Krystallisation (3,8 g) durch Einengen im Vakuum gewonnen. Durch besondere

Fraktionierung ist aus den drei ersten Fällungen noch 1,2 g gutes Pikrat dargestellt worden.

Vierte Fraktionierung. Aus den 13,1 g ist nochmals das Pyrrol frei gemacht worden. Zur Sicherheit haben wir endlich die mit dem ersten Zehntel der erforderlichen Pikrinsäure entstandene Fällung (0,4 g vom Schmelzpunkt 107—108°) verworfen. Die folgenden Ausscheidungen, im ganzen 11,2 g Pikrat vom Schmelzpunkt 108° bildeten unser Ausgangsmaterial für die Bereitung des freien Hämopyrrols.

Die destillierte Base hat in der Tat wieder das Pikrat vom Schmelzpunkt 108° geliefert und bei wiederholtem Umkrystallisieren konnten wir keine Fraktion von anderem Schmelzpunkt beobachten.

Phyllopyrrol.

Aus 48 g leichtest löslicher Pikrate (Hauptfraktion III) machten wir die Base frei und versuchten beigemischtes Hämopyrrol durch Zusatz von Pikrinsäure in kleinen Anteilen zur ätherischen Lösung (300 ccm) abzutrennen. Durch 66 ccm und 50 ccm Pikrinsäurelösung (5 g in 100 ccm enthaltend) und beim Einengen auf ein Drittel des Volumens wurde nur ein wenig Harz gefällt, beim Versetzen mit weiteren 50 ccm Pikrinsäure nur 0,5 g Krystalle vom Schmelzpunkt 92°, die wir verwarfen. Das Filtrat lieferte beim Sättigen mit 25 g feingepulverter Pikrinsäure eine Krystallisation von 30 g und bei mäßigem Konzentrieren noch 3 g Pikrat vom unscharfen Schmelzpunkt 92°. Aus dieser Fraktion von 33 g ist das Phyllopyrrol in Freiheit gesetzt worden.

3. Isolierung der Hämopyrrole aus Chlorophyll.

Das Gemisch von Phytochlorin und Phytorhodin, wie es bei der Hydrolyse von guten Phäophytinpräparaten entsteht, ist der Reduktion in Eisessig-Salzsäurelösung mit Zinngranalien bei 100° unterworfen worden. Die ätherische Lösung der flüchtigen Basen gab nach der Reinigung mit Phosphorsäure bei zwei Versuchen mit je 50 g Substanz sofort eine Fällung mit Pikrinsäure (Versuch I 4,7 g, Versuch II 5,5 g) vom Schmelzpunkt etwa 110°, der beim

Umkrystallisieren aus Alkohol auf 116° stieg. Aus dem Filtrat konnten wir nach starkem Einengen mit pulverförmiger Pikrinsäure auch das Salz vom Schmelzpunkt 92—93° der krystallisierenden Base (Versuch I 4,1 g, Versuch II 2,5 g) ausscheiden.

Nach derselben Methode lieferten einmal 10 g ganz reines Phytochlorin e eine bei 117° und eine zweite bei 108° schmelzende Pikratfraktion (zusammen 2,95 g); Phyllopyrrol blieb in der Mutterlauge.

Ähnlich war die Ausbeute bei der reduzierenden Spaltung nach dem Verfahren von Nencki und Zaleski. Die Arbeitsweise war dieselbe wie beim Hämin. 50 g Chlorin-Rhodingemisch sind in 1 l Eisessig und 1 kg Jodwasserstoffsäure vom spezifischen Gewicht 1,96 gelöst, 1 Stunde auf 100° erhitzt und dann bis zur Aufhellung zu Braun mit Jodphosphonium versetzt worden. Die Ätherlösung der wasserdampfflüchtigen Basen lieferte

1. 7,7 g Pikrat vom Schmelzpunkt 116°,
2. 1,7 g „ „ „ 113°,
3. 6,8 g „ „ „ 94°.

Die zwei ersten Abscheidungen waren Gemische der beiden Hämopyrrolpikrate, die letzte Krystallisation bestand aus ziemlich reinem Phyllopyrrol. Diese aus zwei gleichartigen Pikratdarstellungen in Freiheit gesetzte Base destillierte unter 10 mm Druck bei 89° und schmolz nach dem Abpressen auf Ton bei 55—57°.

Einen ebensolchen Reduktionsversuch haben wir mit 25 g reinem Phytochlorin e ausgeführt. Die erste Abscheidung von Pikrat (3,8 g) erreichte nach dem Umkrystallisieren aus Alkohol den Schmelzpunkt 118—119°, die zweite (1,5 g) den Schmelzpunkt 108°. Das Phyllopyrrol ist diesmal nicht isoliert worden.

Bei diesen Versuchen mit Phytochlorin erreichte die Ausbeute an den zwei Hämopyrrolen zusammen 10%, und die Ausbeute an Phyllopyrrol $5^1/_2$% vom Gewicht des Phytochlorins. Von den Basen zusammen wurden bisher nur rund drei Viertel der Theorie für 1 Mol Base aus 1 Mol Phytochlorin isoliert.

Mit anderen Chlorophyllderivaten haben wir bei vorläufigen Bestimmungen folgende Ausbeuten an Hämopyrrolen erzielt, die

wir nach Nencki und Zaleski einfach in Form der Quecksilberchloridverbindung bestimmt, nämlich im Goochtiegel gewogen haben.

1 g Äthylchlorophyllid (a mit b) lieferte 0,923 g Hg-Verbindung, das ist 0,15 g Hämopyrrole.

1 g Phylloporphyrin lieferte 2,04 g Hg-Verbindung, das ist 0,33 g Hämopyrrole.

2,5 g Phylloporphyrin lieferten 5,12 g Hg-Verbindung, das ist 0,82 g Hämopyrrole.

Also hat 1 Mol Phylloporphyrin fast 1,4 Mole der durch Quecksilberchlorid fällbaren Hämopyrrole geliefert.

4. Beschreibung der Pyrrole aus Chlorophyll.

Phyllopyrrol, $C_9H_{15}N$,

destilliert unter 10 mm Druck konstant zwischen 88—90° und siedet bei 725 mm Barometerstand bei 213° (nach Schleiermacher bestimmt). Aus Äther oder Petroläther krystallisiert das Phyllopyrrol in schneeweißen, unscharf vierseitigen, glimmerähnlich glänzenden Blättchen vom Schmelzpunkt 66—67°. An der Luft ist es sehr unbeständig.

Kalium reagiert unter stürmischer Wasserstoffentwicklung und gibt ein krystallinisches Kaliumsalz. In 1 prozentiger Salzsäure löst sich die Base sehr träge, schneller in konzentrierteren Mineralsäuren.

Die bekannten Farbreaktionen der Pyrrole zeigt das Phyllopyrrol nicht (zum Unterschied von den anderen Hämopyrrolkomponenten) und seine wässerige (Essigsäure und etwas Alkohol enthaltende) Lösung wird von Quecksilberchlorid nicht ausgefällt.

Das Pikrat krystallisiert in dunkelgelben kleinen Prismen vom Schmelzpunkt 95°.

Die Tetrahydroverbindung entsteht nur vermischt mit dem Pyrrolin beim Erhitzen mit Jodwasserstoff und Phosphor auf 250°; aber die Hydrierung läßt sich mit Wasserstoff und Platin nach dem von Willstätter und Waser[1]) für ungesättigte Basen erprobten Verfahren zu Ende führen. Das Pyrrolidin destilliert

[1]) Ber. d. d. chem. Ges. 43, 1176 [1910].

zwischen 160—164°, eine piperidinähnlich riechende, leicht bewegliche Flüssigkeit von $d_4^0 = 0{,}843$.

Isohämopyrrol, $C_8H_{13}N$

siedet unter 725 mm Druck bei 198°, unter 11—12 mm bei 88° als farbloses (im Gegensatz zu älteren Angaben über Hämopyrrol) nicht fluorescierendes Öl von anhaftendem Geruch; $d_4^{20} = 0{,}915$. Es erstarrt leicht zu einer blättrigen Krystallmasse vom Schmelzpunkt 16—17°

Zur Kennzeichnung der Pyrrole finden wir die styphninsauren Salze besonders geeignet, da sie sich durch Krystallisationsvermögen, Schwerlöslichkeit und Haltbarkeit auszeichnen. Das „Styphnat" des Isohämopyrrols bildet gelbe, viereckige Prismen vom Schmelzpunkt 136°, die in kaltem Alkohol schwer löslich sind.

Das Tetrahydroderivat siedet um 43° niedriger als das Pyrrol und ist viel leichter als dieses; $d_4^0 = 0{,}845$.

Hämopyrrol.

Das Pyrrol aus der II. Hauptfraktion der Pikrate entsprach auch der Zusammensetzung $C_8H_{13}N$; es destillierte unter 12 mm Druck bei 86—87° und krystallisierte nicht. Der Schmelzpunkt des Styphnates lag bei 120—121°. Mit salpetriger Säure nach Piloty oxydiert, lieferte es ein scharf bei 201° schmelzendes Methyläthylmaleinimidoxim, während aus Isohämopyrrol unter gleichen Umständen ein Isomeres vom Schmelzpunkt 219° entstand.

XXIII. Die carboxylfreien Stammsubstanzen: Ätiophyllin und Ätioporphyrin[1]).

1. Bildung.

Die Decarboxylierung durch Erhitzen mit methylalkoholischer Kalilauge im geschlossenen Gefäß hat glatt zu den Monocarbonsäuren geführt, aber nicht über diese hinaus. Bei gegen 250° trat Zersetzung ein unter Bildung von amorphen braunen Produkten und von Hämopyrrolen, und es gelang nicht, das carboxylfreie Phyllin oder Porphyrin so zu bilden. Wahrscheinlich dauerte bei diesem Versuch das Erhitzen zu lang. Beim Kochen mit Chinolin und Acridin blieb Phylloporphyrin unverändert; decarboxylierende Bakterien (wir verdanken der Fabrik von F. Hoffmann-La Roche in Grenzach eine Reinkultur von Bakterien, die Histidin elegant decarboxylierten) griffen Rhodophyllin nicht an.

Am besten gelingt die Decarboxylierung bei kurzem Erhitzen von Phyllinen und Porphyrinen mit Natronkalk im Reagierrohr in kleinen Mengen, nur muß man dabei die geeignete Temperatur treffen, bei der Kohlensäure schon abgespalten, aber die empfindliche Substanz noch nicht zerstört wird. Die Zerfallstemperatur der angewandten Alkalisalze liegt jedenfalls höher als die Temperatur, bei der sich während der Dauer des Versuches das Reaktionsprodukt bereits zersetzt.

Die Phylline spalten Kohlensäure merklich leichter ab als die Porphyrine; es entsteht weniger Nebenprodukt und noch fast kein Hämopyrrol. Daher ist es leichter, Ätiophyllin darzustellen als

[1]) Aus einer unveröffentlichten Arbeit von R. Willstätter und M. Fischer.

Ätioporphyrin, und das beste Verfahren für das carboxylfreie Porphyrin führt über das Phyllin, welches mit ziemlich starker Säure von Magnesium befreit wird. Umgekehrt gelingt es nach der Methode von Willstätter und Forsén, das Magnesium wieder in Ätioporphyrin einzuführen, nämlich durch Einwirkung von Grignardschem Reagens.

Bei der Darstellung des Phyllins ist mit besonderer Vorsicht darauf zu achten, daß kein Fremdmetall, z. B. kein Eisen an die Stelle von Magnesium tritt; das Porphyrin läßt sich wohl vollständig von fremden Metallen befreien, aber nicht das Phyllin.

Die carboxylfreien Verbindungen sind überhaupt schwierig zu reinigen. Infolge ihrer Indifferenz gegen Alkalien kann man wohl die sauren Beimischungen entfernen. Auch läßt sich das Ätiophyllin in ätherischer Lösung mit verdünnter Salzsäure, gegen welche es große Beständigkeit zeigt, waschen und das Porphyrin damit nach der allgemeinen Methode für die Trennung der Chlorophyllderivate fraktionieren. Aber diese Verfahren waren nicht ausreichend. Dem Ätiophyllin blieb hartnäckig eine magnesiumhaltige unbeständige Substanz beigemischt, die erst durch Ausfällen mit Petroläther aus der ätherischen Lösung entfernt werden konnte. Das Ätioporphyrin wurde am reinsten aus seinem krystallisierten Styphnat isoliert.

Eine hohe Ausbeute ist bei der Kohlensäureabspaltung mit Natronkalk natürlich nicht zu erwarten, weil immer ein Teil unverändert bleibt und ein anderer Teil zerstört wird. Immerhin erreichen wir eine Ausbeute von 14% der Theorie an Ätiophyllin aus Rhodophyllin und eine Ausbeute von gegen 10% Ätioporphyrin aus Phylloporphyrin.

Aus Phyllo- und aus Pyrroporphyrin wurde das nämliche Ätioporphyrin erhalten, und es ist identisch mit dem aus Rhodophyllin über Ätiophyllin gewonnenen.

Ätiophyllin. Rhodophyllinkalium wird sorgfältig mit der vier- bis fünffachen Menge von reinem (eisenfreiem) Natronkalk verrieben und im Reagierrohr in Portionen aus je 0,05—0,1 g Kaliumsalz über einer kleinen Flamme vorsichtig aber rasch erhitzt, wobei durch ständiges Bewegen das Anhaften der Substanz an der Glaswand verhütet wird. Bei dem gleichmäßigen Erhitzen

beobachten wir einen plötzlichen Farbwechsel von Hellgrau in Braun; zugleich wird etwas Hämopyrrolgeruch bemerkbar. Bei diesem Punkt ist das Erhitzen sofort zu unterbrechen und durch Abkühlen in einer Schale mit Kupferpulver die Temperatur schnell herabzudrücken. Das erkaltete Reaktionsprodukt wird mit etwas Wasser angefeuchtet und unter kurzem Erwärmen und Schütteln mit reinem (fettfreiem) Äther ausgezogen. Die aus 10 g Rhodophyllinkalium erhaltenen Lösungen sind vereinigt und durch aufeinanderfolgende Einwirkung von Alkali und Säure gereinigt worden. Da das Ätiophyllin keine ausgesprochen sauren Eigenschaften aufweist, wird die ätherische Lösung zunächst mit reiner (zink- und kupferfreier) konzentrierter methylalkoholischer Kalilauge durchgeschüttelt. Die Lauge nimmt mit brauner Farbe saure Nebenprodukte und einen Teil des Ätiophyllins auf. Ohne vom Äther abzutrennen, verdünnen wir die alkalische Schicht mit Wasser, wobei amorphe Flocken ausfallen und das Phyllin wieder vollständig in Äther übergeht. Ob die Lösung Ätioporphyrin enthält, prüft man durch Schütteln mit 4prozentiger Salzsäure. Das Phyllin ist beständig gegen sie, beigemischtes Porphyrin geht mit rötlicher Farbe in die Säure über. Nach dem ausgearbeiteten Verfahren entsteht indessen kein Porphyrin. Dennoch empfiehlt es sich, die ätherische Lösung mit einigen Hundert Kubikzentimeter 5prozentiger Salzsäure etwa zehnmal tüchtig auszuschütteln, wodurch wieder braune Flocken ausgefällt werden. Zuletzt wird mit verdünntem Ammoniak alle Säure entfernt. Die bis auf 2 ccm eingedampfte Lösung erstarrte in einem Versuch zu einem krystallinischen Brei; das Präparat ließ sich aus Äther umkrystallisieren, worin es sich spielend löst. Die Lösung wurde ohne Trocknung filtriert und auf 1 ccm eingeengt. Dann schied sich das Ätiophyllin in schönen, blauvioletten Krystalldrusen aus, die unter dem Mikroskop taflige und prismatische Formen zeigten und je nach der Dicke rosarot bis violett in der Durchsicht waren. Die Ausbeute an Rohprodukt betrug 0,5—0,6, an umkrystallisierter Substanz 0,4 g.

In anderen Versuchen krystallisierte das Ätiophyllin nicht aus, wahrscheinlich, weil es weniger rein war. Auch wurde bei längerem Stehen seine anfangs blaustichig rote Lösung in Äther oder in

Benzol mißfarbig. Nach dem Konzentrieren ließ sich mit Petroläther eine Beimischung ausfällen, die zwar gleich den Phyllinen fluorescierte, aber von unschöner brauner Farbe war. Sie gab mit Säure unter reichlicher Bildung amorpher Flocken ein in Äther gelbbraunes Porphyrin. Das Nebenprodukt, selbst unbeständig, scheint die Haltbarkeit des Ätiophyllins zu beeinträchtigen. Es hat keine saueren Eigenschaften, ist aber sauerstoffhaltig; vielleicht hat es den Sauerstoff erst während der Operationen aufgenommen. Nach seiner Entfernung ist das Ätiophyllin rein und auch in verdünnter ätherischer Lösung gut haltbar mit sehr schöner, fuchsienroter Farbe.

Bildung aus Ätioporphyrin: Die konzentrierte Lösung in trockenem Äther wird durch Magnesiummethyljodid vollständig als hellroter Niederschlag gefällt; beim Schütteln der Suspension mit primärem Phosphat entsteht die stark fluorescierende Phyllinlösung.

Ätioporphyrin. Die gereinigte Lösung des Ätiophyllins (aus 6 g Rhodophyllinkalium) wird mit 20 prozentiger Salzsäure durchgeschüttelt; die Zersetzung erfolgt augenblicklich und das Porphyrin geht mit violettroter Farbe in die Säure über. Daraus wird es durch Neutralisieren mit Ammoniak in frischen Äther übergeführt und von neuem mit 4 prozentiger Salzsäure extrahiert, wofür mehrmaliges Ausziehen erforderlich ist. Der Äther behält nur schwach bräunliche Farbe. Unter annäherndem Neutralisieren bringen wir das Porphyrin wieder in Äther und dampfen bis auf 10—20 ccm ein; das Porphyrin beginnt nun sich abzuscheiden und bildet eine schöne violettglänzende krystallinische Kruste (0,6 g).

Zur Darstellung aus Phyllo- (und Pyrro- oder Rhodo-)porphyrin wird die innig verriebene Mischung mit dem Natronkalk ebenso kurz aber höher erhitzt als bei dem Phyllin, bis plötzlich heftige Entwicklung von Dämpfen eintritt. Nach dem Anfeuchten und Ausziehen mit Äther haben wir die vereinigten Lösungen aus zahlreichen kleinen Portionen mit 1 prozentiger Salzsäure viermal gewaschen. Dabei wird ein in geringer Menge auftretendes Nebenprodukt entfernt, das mit leuchtend roter Farbe in die Säure geht; es ist stark

basisch und krystallisiert schön. Sodann wurde der Äther mit 10 proz. Ammoniak öfters ausgeschüttelt und dadurch das Ammoniumsalz einer Säure in Flocken niedergeschlagen, die schwächer basisch ist als Phyllo- und Pyrroporphyrin. Wird das Ätioporphyrin nun isoliert, so ist es noch nicht frei von Mineralbestandteilen; deshalb führen wir es mindestens einmal aus dem Äther in 10 proz. Salzsäure über, wobei ein wenig metallhaltiges Produkt im Äther hinterbleibt. Dann äthern wir lediglich unter Verdünnen wieder aus und lassen die Substanz, die in reinem Zustand schwer löslich ist, aus der mäßig konzentrierten Ätherlösung krystallisieren; sie bildet krystallinische Aggregate. Die Ausbeute beträgt 6—10% vom Ausgangsmaterial.

2. Beschreibung.

Das Ätiophyllin ist entsprechend der Formel $C_{31}H_{34}N_4Mg$ zusammengesetzt; es gibt fast 8% Asche von reinem MgO.

Seine ätherische Lösung ist gegen 4—7 prozentige Salzsäure beim Durchschütteln und mehrstündigem Stehen beständig, also viel widerstandsfähiger als die Carbonsäuren der Phyllinreihe.

Erst an 15 prozentige Salzsäure wird sofort ein kleiner Teil abgegeben, während die ätherische Lösung noch in Farbe und Fluorescenz unverändert bleibt. Auch beim Vermischen der ätherischen Lösung mit Eisessig verliert das Ätiophyllin nicht leicht das Magnesium. Erst nach einigem Stehen verschwindet die Fluorescenz.

Ganz anders und sehr auffallend ist das Verhalten einer petrolätherischen Ätiophyllinlösung gegen verdünnte Säure. Schon mit 0,05 proz. Salzsäure schlägt die Farbe sofort in den Bronzeton des Ätioporphyrins um, mit noch verdünnterer Säure allerdings nicht mehr. Gegen 1- bis 3 prozentige Salzsäure verhält sich Ätiophyllin in Petroläther nicht anders wie fertiges Ätioporphyrin. Ein Teil des Porphyrins geht in Lösung, ein anderer Teil krystallisiert als Chlorhydrat in glitzernden langen Nadeln aus.

Beim Erwärmen mit methylalkoholischer Kalilauge geht die Substanz mit roter Farbe in Lösung; kocht man den Alkohol weg, so fällt sie aus und geht beim Verdünnen unverändert in Äther.

Das Ätiophyllin ist in Äther und Alkohol äußerst leicht und auch in den anderen organischen Lösungsmitteln sehr leicht löslich, mit Ausnahme von Petroläther, worin es schwerlöslich ist. Die alkoholische Lösung ist blaurot und besitzt starke Fluorescenz wie die Lösung in Äther, verdünnt zeigt sie prächtige violettrote Farbe.

Beim Verdunsten der Lösung in Petroläther krystallisiert das Phyllin in rhombenförmigen Täfelchen aus, ähnlich dem Carotin aber noch tiefer rot. Diese Rhomben sind oft spindelförmig gerundet und neigen zur Bildung von Zwillingen und Durchwachsungsdrillingen.

Beim Trocknen im Hochvakuum änderte sich die Löslichkeit nicht. Im Schmelzpunktsrohr sintert die Sustanz über 160°, schmilzt unscharf bei etwa 205° und erweist sich noch bei 250° als unverändert.

Ätioporphyrin, $C_{31}H_{36}N_4$. Die Salzsäurezahl des Porphyrins ist 3, seine Verteilungszahl für 3 prozentige Salzsäure 40. Sein Schmelzpunkt liegt bei ungefähr 280°; das Pulver hat ähnliche Farbe wie Alizarin auf Chrombeize. Das Porphyrin ist in Alkohol in der Kälte wenig, viel mehr, aber doch noch ziemlich schwer, beim Kochen löslich. Die alkoholische Lösung ist braunrot, von etwas mehr roter Nuance als die ätherische und fluoresciert viel schwächer als die Phylline, stärker als Pyrroporphyrin. In Eisessig ist es in der Wärme beträchtlich, in Aceton leicht löslich. In Ameisensäure löst es sich spielend mit prächtig blaustichig roter Farbe. Beim Kochen mit methylalkoholischer Kalilauge bleibt die Substanz unverändert.

Mit Schwermetallsalzen bildet das Ätioporphyrin charakteristische Komplexverbindungen. Die Eisessiglösung wird beim Erwärmen mit Zinkacetat rein rot, mit Kupferacetat rotviolett, beim Überführen in Äther gleichfalls rot. Das Kupferderivat widersteht der Einwirkung von konzentrierter Salzsäure, die Zinkverbindung wird von verdünnter Mineralsäure wie Ätiophyllin gespalten.

Mit Pikrinsäure, Platinchlorwasserstoffsäure und anderen Säuren bildet das Ätioporphyrin schöne Salze. Das Pikrat wird aus Äther in roten Flocken gefällt, bei langsamer Abscheidung bildet es

schöne rote Prismen mit domatischer Begrenzung. Das Styphnat (Schmelzpunkt 170°) krystallisiert in rosafarbigen Prismen mit häufigen Zwillingsbildungen. Mit ätherischem Goldchlorid entsteht eine rotviolette krystallinische Fällung.

Das Chlorhydrat krystallisiert in langen olivbraunen Nadeln, wenn man die ätherische Porphyrinlösung langsam mit chlorwasserstoffhaltigem Äther versetzt.

Mit Dimethylaminobenzaldehyd reagiert die salzsaure Lösung nicht.

Absorptionsspektra.

Ätiophyllin. Das Absorptionsspektrum (Fig. 16) ist sehr ähnlich dem von Pyrrophyllin, namentlich von umkrystallisiertem. Zu den charakteristischen Absorptionsbändern in der gelben und grünen Region tritt noch ein weniger intensives, eigentümlich geripptes Band im Blau. Das Spektrum weist in der sichtbaren Region außer drei schwachen Streifen im Rot die zwei Hauptbänder im Gelb und Grün, ein schwächeres Band beim Übergang von Grün in Blau und das im Blau und Indigoblau liegende gegliederte Band auf.

0,0488 g in 1 l Äther ($^1/_{1000}$ Mol in 10 l).

Schicht in mm	10	20	40
Band I	—	646 | 640	646.640 | 636
„ II	—	622 | 619	622 | 619
„ III	—	614 | 610	614 | 610
„ IV	583—572	585—572	586—570 |
„ V	550 | 548—538 | 532	559.550—531.527	560.555—526. 523
„ VI	504 | 491	507.487	508...486
„ VII	—	471 | 458.454 | 447 ..445 |	472.467 | 460.. 455 | 449... 445 |
Endabsorption	422—	430—	434—

Reihenfolge nach der Intensität: Endabsorption, V, IV, VI, VII, I, II, III.

Ätioporphyrin. Beim Austritt von Magnesium wird das Spektrum in der gelben und grünen Region aufgehellt, während

die Absorption im Blau verstärkt wird. Ätioporphyrin zeigt ein kompliziertes Spektrum (Fig. 16), ähnlich dem Pyrroporphyrin, mit hauptsächlich vier starken Bändern, wovon eines im Orange, ein eigentümlich gegliedertes in der gelbgrünen Region, das nächste im Grün, das vierte, stärkste und besonders scharfe (VIII) im Blau liegt; dazu kommt noch die bedeutende Absorption im Violett.

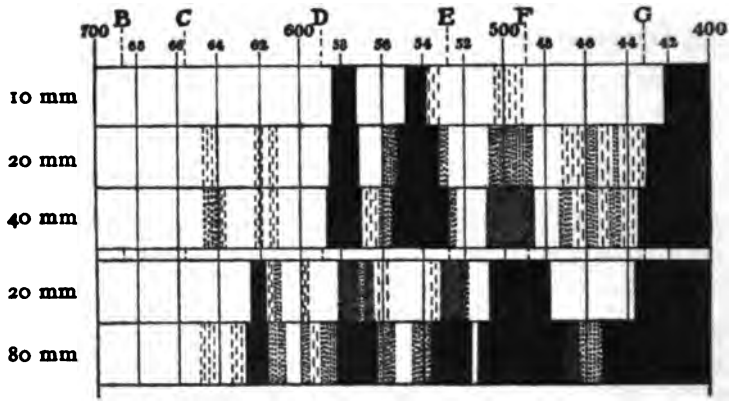


Fig. 16. Absorptionsspektrum von Ätiophyllin (oben) und Ätioporphyrin (unten).

0,0464 g in 1 l Äther ($^1/_{1000}$ Mol in 10 l).

Schicht in mm	10	20	80
Band I	—	—	649.643
„ II	624— —620	624—619 |	633 | 626—618...
„ III	612 | 609	613.609	609
„ IV	598 | 593	598 | 593	598..593 |
„ V	580.572	581...572.	588.582—563..
„ VI	568...565 | 556	569— —564 | 556	556
„ VII	533 | 530..525... 523.518	536 | 531— —522 ..518	545.538—519
„ VIII	505—479	507—479	514—475...463.
Endabsorption	427—	435—	452—

Reihenfolge nach der Intensität: Endabsorption, VIII, VII, II, VI, V, III, IV, I.

XXIV. Abbau des Hämins.

1. Gewinnung von Hämin.

Verbesserung des Verfahrens von Schalfejeff.

Nach dem Verfahren von Schalfejeff sowie von Nencki und Zaleski wird frisches, defibriniertes Blut mit heißem, chlornatriumhaltigem Eisessig behandelt. Dafür ist nach W. Küster (in Abderhaldens Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden Bd. II, S. 619) mindestens das Vierfache des Blutes an Eisessig erforderlich.

Es gelingt aber, diese Menge auf das Dreifache vom Blut herabzusetzen und nach einer abgeänderten Arbeitsweise bedeutende Mengen von Hämin mit den einfachsten Hilfsmitteln zu gewinnen[1]).

Wir erhitzen auf dem Dampfbade oder auf Gasöfen 5 Rundkolben von 4 l Inhalt, die mit je 3 l Eisessig unter Zusatz von etwas festem Kochsalz oder von 1 ccm gesättigter Kochsalzlösung auf den Liter Eisessig beschickt werden.

In jeden Kolben, dessen Inhalt wir durch häufiges Umschwenken oder durch einen gutwirkenden Rührer in Bewegung halten, lassen wir aus einem Tropftrichter defibriniertes und durch Koliertuch filtriertes Blut in dünnem Strahl unter fortdauerndem Erwärmen einfließen, so daß die Temperatur des Kolbeninhalts nicht unter 95° sinkt. Das Abflußrohr des Tropftrichters endet in der Mitte zwischen Rührer und Wandung des Kolbenhalses so hoch, daß die Eisessigdämpfe es nicht bespülen und es nicht mit Eiweißgerinnsel verstopfen; die Berührung des einfließenden Blutes mit der Kolben-

[1]) Ann. d. Chem. 373, 232 [1910] und 385, 197 [1911], neu bearbeitet.

wand ist zu vermeiden. Nach dem Einlaufen des Blutes wird die Flüssigkeit noch eine Viertelstunde in schwachem Sieden gehalten, wobei sich schon ein großer Teil des Hämins in glitzernden Krystallen ausscheidet.

Nach 2—3 Tagen dekantiert man die etwas zähflüssige Mutterlauge, aus der bei längerem Stehen noch ein wenig Hämin auskrystallisiert, vorsichtig vom Krystallbrei ab und filtriert diesen auf der Nutsche unter Saugen an der Pumpe durch eine mehrfache Lage von Koliertuch; die Krystalle werden mit verdünnter Essigsäure, Wasser, Alkohol und Äther gewaschen.

Die Ausbeute beträgt, wahrscheinlich mit der Zusammensetzung des Blutes wechselnd, $4^1/_4$—$5^1/_2$ g an reinem Hämin aus 1 l Blut.

Gewinnung aus zentrifugiertem Blut[1]).

Wir zentrifugieren defibriniertes Blut unverdünnt, während es sonst üblich ist, es zuvor mit Kochsalzlösung stark zu verdünnen.

Mit einer Laboratoriumszentrifuge von Gebrüder Heine in Viersen, deren Kranzdurchmesser 66 cm beträgt, die 3000 Touren in der Minute macht und in 6 Gläsern 1,9 l faßt, wird die Hälfte des Rinderblutes als Blutkörperchenbrei abgesetzt. Es ist aber schwierig, das Serum vollständig abzuheben, so daß aus 1900 ccm Blut doch praktisch 1100 ccm Blutkörperchen erhalten werden. Beim Vermischen mit 0,9 prozentiger Kochsalzlösung und erneutem Zentrifugieren bleibt das Volumen des konzentrierten Blutes unverändert.

Viel günstiger wirkt eine Jouan-Zentrifuge mit hoher Tourenzahl von Leune in Paris (Modell C mit elektrischem Antrieb, 9000 Touren mit den Gläsern von 120 ccm Gesamtinhalt, äußerer Kranzdurchmesser 24 cm) und zwar besonders bei Anwendung ihres sogenannten Bol métallique (innerer Durchmesser 18 cm, Volumen $1^1/_2$ l und 5000—5500 Touren), der das Füllen und Entleeren bei laufender Zentrifuge gestattet. Trotz des kleineren Weges pro Sekunde wird die Leistung der großen Zentrifuge übertroffen.

[1]) Unveröffentlicht.

Von einem Liter Rinderblut werden nämlich nach 10 Minuten 635—640 ccm, bei einer andern Probe 660 ccm klares Serum, d. i. annähernd die größte mögliche Menge, abgelassen. Stellt man dann die Zentrifuge ab, so enthält der Bol die Suspension der unveränderten Blutkörperchen (340—365 ccm). Entleert man aber bei laufender Zentrifuge durch die Messingröhre des Apparates, so werden die Blutkörperchen durch den Anprall an die Wand der Abflußröhre zerschlagen und es läuft aus dem Bol eine lackfarbene, prächtig tiefrote Oxyhämoglobinlösung ab; das ist das gesamte Oxyhämoglobin des Blutes, klar vermischt mit der kleinsten Wassermenge. Unter dem Mikroskop sind in der roten Lösung nur die Schatten der Blutkörperchen zu erkennen.

Beim Waschen des unversehrten Blutkörperchenbreis, wie er durch langsames Arretieren der Zentrifuge erhalten wird, mit Kochsalzlösung und Ausschleudern im Bol nimmt das Volumen nicht ab, auch nicht bei 9000 Touren in den Gläschen der Zentrifuge; das Waschen ist für die Hämingewinnung ohne Nutzen. Nach dem Zerschlagen kann man natürlich nicht mehr waschen, da die Oxyhämoglobinlösung mit der Kochsalzlösung mischbar ist.

Die Anwendung der Oxyhämoglobinlösung hat für die Häminbereitung gegenüber der Verarbeitung von Blutkörperchenbrei den Vorzug, daß die Entleerung des Apparates leichter erfolgt und daß man kontinuierlich größere Mengen nachfüllen und entleeren kann, ohne die Zentrifuge dabei abzustellen.

Das Zentrifugieren des Blutes und die Behandlung der gewonnenen Hämoglobinlösung mit Eisessig lassen sich bequem nebeneinander ausführen. Die Arbeitsweise ist nicht weniger einfach, das Hämin ebenso rein, wie nach den älteren Verfahren. Anstatt des Vierfachen oder des Dreifachen vom Blute an Eisessig genügt es, gleichviel Eisessig wie Blut anzuwenden.

Ausführung des Verfahrens. Man läßt frisches, defibriniertes Rinderblut in Portionen von 1 l in den mit 3000 Touren in der Minute rotierenden Bol durch ein 2 mm weites Röhrchen einlaufen, steigert alsdann die Tourenzahl innerhalb einer Minute auf etwa 5500 und läßt die Zentrifuge 10 Minuten mit dieser Geschwindigkeit gehen. Nun wird das nahezu farblose Serum durch

langsames Senken des Entleerungsröhrchens abgehoben, bis die Flüssigkeit plötzlich tiefrot abfließt, und dann in ein anderes Gefäß die lackfarbige Oxyhämoglobinlösung, bis ein leises Zischen in der Zentrifuge die Berührung des Röhrchens mit der Bolwand verrät. Der Bol ist dann bis auf einige ccm entleert, und das Abflußröhrchen wird zurückgeschraubt. Wir schalten nun vor den Elektrometor wieder so viel Widerstand ein, daß der Bol nur mit 3000 Touren pro Minute rotiert und beschicken ihn von neuem.

In Fünfliterrundkolben mit weitem Hals erwärmen wir je 2 l Eisessig, denen wir 10 g Kochsalz zufügen auf Gaskochern zum Sieden und lassen die Oxyhämoglobinlösung aus 2 l Blut (0,7 l) während einer halben Stunde in die durch einen Rührer lebhaft bewegte, schwach siedende Flüssigkeit eintropfen, wobei die Berührung der Oxyhämoglobinlösung mit der Kolbenwand und mit dem Rührer vermieden werden muß. Dann halten wir die tiefbraune Flüssigkeit noch 10 Minuten in schwachem Sieden und lassen hierauf während einer Viertelstunde 1 l destilliertes Wasser zufließen. Das Hämin scheidet sich dabei in glänzenden, groben Krystallen größtenteils aus; bei rascherem Arbeiten krystallisierte es so fein, daß die zur Isolierung erforderliche Filtration sehr erschwert wurde.

Bei eintägigem Stehen wird die Krystallisation vollständig. Wir filtrieren dann durch doppeltes Koliertuch die Krystalle von der nur noch wenig gefärbten Mutterlauge ab und waschen mit Essigsäure, Wasser, Alkohol und Äther etwas nach. Das Präparat ist so rein, daß es keine Umkrystallisation erfordert.

Die Ausbeute an Hämin betrug 4,6—5,2 g aus dem Liter eines Rinderblutes, welches bei Verarbeitung nach dem oben beschriebenen älteren Verfahren 4,2 g Hämin ergab.

2. Hämatoporphyrin[1]).

Hämin läßt sich nicht einfach von Eisen befreien wie Chlorophyll von Magnesium; die Bildung des Hämatoporphyrins ist eine kompliziertere Reaktion. Um diese zu erklären, ist es oft, aber bis

[1]) Aus einer unveröffentlichten Untersuchung von R. Willstätter und M. Fischer.

jetzt vergeblich, versucht worden, Zwischenprodukte der Bildung von Hämatoporphyrin durch Bromwasserstoffsäure zu isolieren. Willstätter und Fischer haben nun bei dieser Reaktion, und zwar bei der Abspaltung des Eisens mit Bromwasserstoff in wässeriger oder Eisessiglösung oder ohne Lösungsmittel eine Reihe bromhaltiger Zwischenprodukte aufgefunden.

Beim Behandeln mit konzentrierter wäßriger Bromwasserstoffsäure (spezifisches Gewicht 1,78) beobachten wir in einem Tage die Umwandlung des in der Hauptmenge ungelöst bleibenden Häminpulvers in neue, glänzende Krystalle, schief abgeschnittene Prismen, die dem Hämin sehr ähnlich sind, aber zwei Moleküle Bromwasserstoff addiert enthalten entsprechend der Formel:

$$C_{33}H_{34}O_4N_4FeBr_3$$

Zum Unterschied von Hämin ist dieses Bromid in Alkohol mit intensiv rotbrauner Farbe leicht, auch in feuchtem Äther beträchtlich löslich. In konzentrierter Schwefelsäure löst es sich leicht mit blaustichig roter Farbe, während Hämin langsam eine grünlichrote Lösung gibt. Die neue Verbindung enthält das Eisen noch fest gebunden, aber den Bromwasserstoff spaltet sie leicht ab, z. B. beim Erhitzen im Hochvakuum; dabei wird Hämin zurückgebildet.

Ein zweites, ebenfalls noch eisenhaltiges, aber bromreicheres Zwischenprodukt von der Formel:

$$C_{33}H_{35}O_4N_4FeBr_4$$

erhalten wir mit Eisessig-Bromwasserstoff, am besten mit Säure von einer für die Lösung nicht geeigneten Konzentration. Beispielsweise verwandelt sich Hämin bei der Einwirkung von etwas zu schwachem Eisessig-Bromwasserstoff (spezifisches Gewicht 1,40) in dieses Bromid. Es ist gleichfalls in Alkohol leicht, aber nicht in Äther löslich.

Ein drittes Zwischenprodukt läßt sich aus der Auflösung von Hämin in Eisessig-Bromwasserstoff durch trockenen Äther als hellrotes Pulver fällen. Es ist bereits frei von Eisen und entspricht der Formel:

$$C_{33}H_{36}O_4N_4Br_4.$$

Endlich tritt eine Carbonsäure mit einem Atom Brom von der Zusammensetzung:

$$C_{33}H_{37}O_6N_4Br$$

in der Form ihres Acetylderivates auf, wenn wir die Eisessig-Bromwasserstofflösung zuerst mit festem Natriumacetat abstumpfen und dann verdünnen, anstatt sie zur Darstellung des Porphyrins mit Wasser versetzt stehen zu lassen und dann zu neutralisieren. Diese bromhaltige Säure krystallisiert aus ihrer ätherischen Lösung in schönen Pyramiden; sie wird leicht zu Hämatoporphyrin hydrolisiert.

Das wichtigste eisenfreie Zwischenprodukt der Hämatoporphyrinbildung entsteht bei der Abspaltung des Eisens durch flüssigen Bromwasserstoff, ein Bromid von der Formel

$$C_{33}H_{39}O_4N_4Br_5.$$

Es lieferte bei vorsichtigem Abstumpfen mit trockenem Natriumcarbonat eine ätherlösliche, zwei Atome Brom enthaltende Säure. Von Salzsäure wird es leicht zu reinem Hämatoporphyrin hydrolisiert und beim Stehen mit Methylalkohol bildet es einen prächtig krystallisierenden Dimethyläther-dimethylester des Hämatoporphyrins.

Aus den beobachteten Zwischenprodukten ist der Schluß zu ziehen, daß zuerst zwei Moleküle Bromwasserstoff an Hämin addiert werden und daß die komplexe Bindung des Eisens dadurch gelockert wird; bei der Porphyrinbildung werden dann die Bromatome durch hydroxyle ersetzt.

Das Hämatoporphyrin ist bisher ausschließlich in amorphem Zustand bekannt; nur das Chlorhydrat ist von Nencki und Zaleski[1]) und von späteren Forschern[2]) krystallisiert erhalten worden. Nach dem folgenden Verfahren entsteht das Hämatoporphyrin selbst in einheitlichem, krystallisiertem Zustand.

Für die Darstellung von Hämatoporphyrin ist es wichtig, Eisessig-Bromwasserstoff von einer ganz bestimmten, geeigneten Konzentration anzuwenden, nämlich vom spezifischen Gewicht 1,41 (bei 0° bestimmt). Damit läßt sich die von Nencki und

[1]) Gesammelte Arbeiten von Nencki, II, Seite 77 u. 754.

[2]) W. Küster in Abderhaldens Handbuch der biochem. Arbeitsmethoden II, 623 [1910]; H. Fischer, E. Bartholomäus u. H. Röse, Zeitschr. f. physiol. Chem. 84, 262 u. 282 [1913].

Zaleski angegebene Versuchsdauer erheblich abkürzen und vollständige Auflösung des Hämins erzielen. Weder eine stärkere, noch eine schwächere Säure finden wir geeignet, um Hämin zu lösen und das Eisen zu eliminieren; z. B. ist die von Kahlbaum käufliche Säure vom spezifischen Gewicht 1,38 nicht gut brauchbar, sogar eine Säure vom spezifischen Gewicht 1,40 ist noch unzweckmäßig.

Das Hämin tragen wir, ohne es zu pulvern, auf einmal in die mit Eis gekühlte Bromwasserstoffsäure ein, die sich in einer gut schließenden Stöpselflasche befindet, z. B. Portionen von 10 g in 250 g der Säure vom spezifischen Gewicht 1,41 und schütteln bei gewöhnlicher Temperatur während eines Tages. Das Hämin geht in dieser Zeit klar in Lösung. Die Flüssigkeit wird in 3 l Wasser gegossen und durch Filtrieren von ganz wenigen ungelösten Partikeln befreit. Die Lösung lassen wir nun zur Hydrolyse der gebildeten Bromverbindung drei Stunden lang stehen und fällen dann mit konzentrierter Natriumacetatlösung das Hämatoporphyrin aus. Im Rohprodukt ist Eisen enthalten, im übrigen ist es eine einheitliche Substanz.

Am besten wird Hämatoporphyrin gekennzeichnet durch seine Salzsäurezahl; zerlegen wir ein gutes Rohprodukt in Fraktionen, so stimmen diese in der Verteilung zwischen Salzsäure und Äther überein.

Man kann das Porphyrin, um es frei von Eisen zu erhalten, nach Nencki in verdünnter Natronlauge lösen und mit Essigsäure wieder fällen. Auch bei der Überführung in den krystallisierten Zustand wird die Substanz frei von mineralischen Bestandteilen.

Die flockige Fällung von Hämatoporphyrin saugen wir auf Koliertuch ab und waschen sie mit Wasser aus. Nun lösen wir das noch feuchte Präparat, zweckmäßig das aus Natronlauge umgefällte, in 1 l Alkohol und tragen die Lösung in 25 l Äther ein, die auf fünf 7 l-Scheidetrichter verteilt sind. Dann waschen wir den Alkohol weg, indem wir durch jeden Scheidetrichter etwa 20 Minuten lang am Brunnen Wasser durchfließen lassen. Allerdings fällt dabei etwas flockiges Calciumsalz aus, das wir sammeln, um es mit Säure zu zer-

setzen und das entbundene Porphyrin zur Hauptmenge zurückzubringen. Die ätherische Lösung haben wir mit Natriumsulfat getrocknet und auf 1 l eingeengt. Bei diesem Volumen beginnt schon in der Wärme das Hämatoporphyrin auszufallen; wir lassen nun die Ätherlösung bei gewöhnlicher Temperatur stehen und erhalten das Porphyrin als glänzende violette Krystallisation, die aus schön gerundet rechteckigen, in der Durchsicht rotbraunen Blättchen besteht. Der Betrag des auskrystallisierten Anteils war 4,5 g.

Das krystallisierte Hämatoporphyrin ist exsiccatortrocken gemäß der Formel $C_{33}H_{38}O_6N_4$ zusammengesetzt. Es verliert bei 105° unter 0,03 mm ein Molekül Wasser, dann ein zweites Molekül unter den gleichen Bedingungen beim Einschalten einer mit flüssiger Luft gekühlten Vorlage.

Aus ätherischer Lösung geht Hämatoporphyrin spurenweise in Salzsäure von 0,03 Prozent, reichlich (ungefähr zwei Drittel) in Säure von 0,1—0,15 Prozent, fast vollständig in 0,4prozentige Säure.

3. Abspaltung des Eisens aus Hämin durch flüssigen Bromwasserstoff[1]).

Durch Einwirkung von Bromwasserstoff auf Hämin im geschlossenen Rohre entsteht bei gewöhnlicher Temperatur das Bromid $C_{33}H_{39}O_4N_4Br_5$, d. i. das bromwasserstoffsaure Salz einer bromhaltigen Carbonsäure, das sich von Eisenbromid trennen läßt. Aus diesem Salz wird die Carbonsäure in Freiheit gesetzt, die zwei Bromatome enthält.

Wir füllen 5 g Häminkrystalle in ein Einschlußrohr und kondensieren darin durch Kühlen mit flüssiger Luft mit Calciumbromid getrocknetes Bromwasserstoffgas (ca. 10 g), wobei wir das Einleitungsrohr etwa 1 cm über dem Dewargefäß enden lassen, um Verstopfen durch den krystallisierenden Bromwasserstoff zu vermeiden. Nach dem Zuschmelzen bleibt die Röhre einige Tage

[1]) Aus einer unveröffentlichten Untersuchung von R. Willstätter und M. Fischer.

stehen; vor dem Öffnen wird sie zuerst mit Kohlensäure-Äther, dann mit flüssiger Luft gekühlt. Der Bromwasserstoff wird verdampft und das violette, metallisch glänzende Rohprodukt (10,3 g), das zerfließlich ist, mit trockenem Äther oftmals verrieben und dadurch vom Ferribromid befreit. Leichter erhalten wir die Bromverbindung eisenfrei durch mehrmaliges Lösen in Aceton und Fällen mit Äther. Das Pentabromid bildet glänzende, in der Durchsicht violette bis rubinrote Blättchen, die keine Krystallformen zeigen.

Um die ätherlösliche Carbonsäure von der Formel $C_{33}H_{36}O_4N_4Br_2$ darzustellen, ist es erforderlich, den Bromwasserstoff dieses Salzes sehr vorsichtig abzustumpfen. Wir lösen das eisenfreie Pentabromid in Aceton (1 g in 20 ccm) und fällen es mit 100 ccm Äther in feiner Verteilung aus; dann wird die Suspension mit überschüssigem wasserfreiem Natriumcarbonat geschüttelt, bis eine klare, rotbraune Lösung entsteht. Sie wird sofort filtriert und mit Petroläther gefällt, da die bromhaltige Säure das Abdampfen der ätherischen Lösung nicht verträgt, sondern dabei in ein bromwasserstoffsaures Salz umgewandelt wird. Nach dem Trocknen ist das dunkle Pulver (0,6 g) in Alkohol und Aceton mit braunroter Farbe leicht löslich, aber nicht mehr in Äther.

Die Hydrolyse des Pentabromids liefert in glatter Weise reines krystallisierendes Hämatoporphyrin; man braucht es nur in mäßig verdünnter Salzsäure aufzulösen, um sofort die Substitution zweier Bromatome durch Hydroxyl zu erzielen. Wir lösen z. B. unter gelindem Erwärmen 5 g Pentabromid in 1 l 20 prozentiger Salzsäure und führen aus der filtrierten Lösung unter sorgfältigem Abstumpfen der Säure mit Ammoniak das gebildete Porphyrin in viel (ca. 15 l) Äther über. Nach dem Abdampfen auf 1 l scheidet sich Hämatoporphyrin als schönes Krystallmehl (1,2 g) aus, worin man sehr oft eine typische Form beobachtet: an beiden Enden abgerundete längliche Blättchen.

Auch bei der Einwirkung von Methylalkohol in der Kälte tritt alles Brom aus. Die entstehende Tetramethylverbindung bildet große rubinrote Pyramiden. Sie ist in Äther auch in getrocknetem Zustand leicht löslich, ihre Salzsäurezahl liegt zwischen 3 und 4.

Sie enthält nur zwei verseifbare Methylgruppen. Bei der Hydrolyse liefert sie den Dimethyläther des Hämatoporphyrins, eine in Äther schwerlösliche Säure, die in braunroten häminähnlichen Blättchen krystallisiert und durch die Salzsäurezahl 1 gekennzeichnet ist.

4. Mesohämin und Hämoporphyrin[1]).

Auf das Hämin und das Hämatoporphyrin haben wir die Methode des Abbaus durch Erhitzen mit Alkalien übertragen, die vom Chlorophyll durch die Reihe der Phylline und Porphyrine bis zu den carboxylfreien Stammsubstanzen geführt hat. Beim Hämin selbst war es nicht möglich, nach dem Verfahren der Ätiophyllinbildung die Carboxyle abzuspalten, ebensowenig beim Hämatoporphyrin; hingegen gelingt die Abspaltung von Kohlensäure bei den Porphyrinen, welche aus Hämin und Hämatoporphyrin beim Erhitzen mit methylalkoholischem Kali hervorgehen.

Bei der Umwandlung des Blutfarbstoffs durch Alkalien bei höherer Temperatur trat dieselbe Schwierigkeit auf wie bei der Chlorophyllkomponente b. Mit methylalkoholischem Kaliumhydroxyd allein war die Reaktion nicht glatt ausführbar, die Substanz ging teilweise zu Grund. Dagegen entstehen bei Gegenwart von viel Pyridin schöne Porphyrine und zwar verschiedene aus Hämin und Hämatoporphyrin; ihre Bildung erfolgt durch einen Reduktionsvorgang.

Beim Hämin bleibt noch bei 200° die komplexe Bindung des Eisens erhalten. Die entstehende Verbindung läßt sich mit konzentrierter Schwefelsäure oder mit Eisessig-Bromwasserstoff vom Eisen befreien und liefert reines Mesoporphyrin, das den Angaben von M. Nencki und J. Zaleski[2]) für das mit Jodwasserstoff und Jodphosphonium dargestellte Reduktionsprodukt entspricht. Die Eisenverbindungen des Mesoporphyrins mit der Gruppe Cl-Fe = und = Fe(OH), von denen die erstere bereits von Zaleski[3]) durch Einwirkung einer Eisenlösung (eigentümlich ist es, daß Zaleski

[1]) Nach unveröffentlichten Versuchen von R. Willstätter und L. Forsén.

[2]) Ber. d. d. chem. Ges. 34, 997 [1901].

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 43, 11 [1904].

ein Ferrosalz angewandt hat) auf Mesoporphyrin gewonnen worden ist, bezeichnen wir als Mesohämin und Mesohämatin.

Durch dieselbe Behandlung mit methylalkoholischem Kali und Pyridin bei 200° geht aus dem Hämatoporphyrin eine dem Mesoporphyrin ähnliche Verbindung hervor, die Hämoporphyrin genannt werden soll. Zahlreiche Analysen haben für sie die Formel

$$C_{32}H_{36}O_4N_4$$

ergeben, während wir für das Mesoporphyrin anstatt der Formel $C_{34}H_{38}O_4N_4$ von Zaleski[1]) dieselbe Formel oder die Zusammensetzung

$$C_{32}H_{38}O_4N_4$$

annehmen, also vielleicht einen Mehrgehalt von zwei Atomen Wasserstoff gegenüber dem Hämoporphyrin.

Die beiden zweibasischen Porphyrine aus Hämin zeigen bei großer Ähnlichkeit auch einige feinere Unterschiede, welche die folgende Tabelle verzeichnet.

	Mesoporphyrin	Hämoporphyrin
Salzsäurezahl	11/4	8/4
Verteilungszahl für 0,5 proz. Salzsäure	12	23,5
Verhalten gegen verd. Salzsäure (5—20%)	löst sich zuerst und scheidet sich sofort in groben Flocken ab	sehr leicht löslich; erst nach langem Stehen krystallisiert das Chlorhydrat in Nadeln aus
Verhalten gegen Alkohl	krystallisiert aus der heißen Lösung sehr gut aus	weniger vollständig auskrystallisierend

Mesohämin.

Die Lösung von 3 g Hämin in 100 ccm Pyridin verrühren wir im Silbertiegel sorgfältig mit 50 ccm methylalkoholischer Kalilauge und erhitzen im Autoklaven vier Stunden auf 200°. Die Reaktion ist beendigt, wenn eine Probe sich nach dem Erkalten in konzentrierter Schwefelsäure mit klarer, roter Farbe löst und ein Porphyrin liefert, dessen ätherische Lösung an 0,1 prozentige Säure

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 54 [1902].

nichts abgibt. Ist die Farbe in der Schwefelsäure noch grünstichig, so enthält die alkalische Masse noch eine Form des Hämins; bei zu weitgehender Einwirkung von Alkali wird die schwefelsaure Lösung mißfarbig braun.

Die alkalische Masse ist erfüllt von glitzernden braunroten Krystallen des Mesohämatinkaliums, langen, gerade abgeschnittenen Prismen, die man durch Verdünnen mit etwas Methylalkohol und Waschen mit Äthylalkohol isolieren kann. In letzterem sind sie unlöslich, in Holzgeist leicht löslich. Ihre Zusammensetzung entspricht der Formel:

$$(C_{31}H_{34}N_4)\ (FeOK)\ (COOK)_2.$$

Mesohämin wird durch Ansäuern mit verdünnter Salzsäure erhalten und durch mehrmaliges Umfällen des Rohproduktes aus siedendem Holzgeist mit Wasser gereinigt. Dann verwandeln wir die Verbindung in ihr Chlorid durch Auflösen in siedendem Eisessig (2 g in 50 ccm) und Versetzen mit etwas konzentrierter Salzsäure (2 ccm). Die ausgeschiedenen dunklen Körner (1 g) lassen sich wie Hämin umkrystallisieren; ihre Lösung in Pyridin trugen wir in warmen, kochsalzhaltigen Eisessig ein. Das Mesohämin schied sich aus Eisessig in den bekannten Formen der Häminkrystalle ab, aus Pyridin-Eisessig in dünnen, in der Durchsicht gelbbraunen Tafeln. Es ist in den üblichen Lösungsmitteln beträchtlicher löslich als Hämin, namentlich in Aceton mäßig löslich, während Hämin darin unlöslich ist.

Seine Zusammensetzung ist $C_{33}H_{36}O_4N_4FeCl$, d. i. $C_{31}H_{34}N_4$ $(FeCl)\ (COOH)_2$ (mit einer Unsicherheit in der Zahl der H-atome).

Durch konzentrierte Schwefelsäure oder besser durch Eisessig-Bromwasserstoff wird dem Mesohämin das Eisen entzogen unter Bildung des Mesoporphyrins, das wir beim Vergleiche übereinstimmend fanden mit einem nach Nenckis und Zaleskis Verfahren bereiteten Präparat.

Hämoporphyrin.

Beim Behandeln des Hämatoporphyrins mit methylalkoholischer Kalilauge verfuhren wir fast ebenso wie beim Hämin.

2 g Hämatoporphyrin wurden mit 100 ccm Pyridin und 50 ccm alkoholischem Kali im Autoklaven 4—5 Stunden auf 200° erhitzt. Die vollständige Umwandlung zeigt sich in der Veränderung der basischen Eigenschaften; die ätherische Lösung des Reaktionsproduktes färbt 0,1 prozentige Salzsäure nicht mehr an.

Der Silbertiegel des Autoklaven enthielt das Kaliumsalz am Boden krystallinisch ausgeschieden, das Pyridin ließ sich davon dekantieren. Beim Ansäuern entstand das freie Hämoporphyrin in fast quantitativer Ausbeute, aber rein wurde es erst durch Fraktionierung mit Salzsäure nach der Methode von Willstätter und Mieg. Wir nahmen das Rohprodukt in konzentrierter Salzsäure auf und führten es unter Verdünnen und Neutralisieren in Äther über. Nach mehrmaligem Waschen der ätherischen Lösung extrahierten wir daraus mit 2—3 prozentiger Salzsäure das Hämoporphyrin und beseitigten eine gelb gefärbte Beimischung aus der sauren Lösung durch wiederholtes Ausäthern. Dann ging aus der schön roten, fluorescierenden Chlorhydratlösung das reine Porphyrin beim Abstumpfen der Säure in Äther über. Es krystallisierte beim Einengen in haarfeinen rotbraunen Nadeln, aus einer getrockneten ätherischen Lösung in dicken, in der Durchsicht roten Tafeln, die oft rhombischen Umriß zeigten.

Das Hämoporphyrin ist in den meisten Lösungsmitteln unlöslich, aus viel siedendem Äther läßt es sich aber umkrystallisieren. Im Eisessig löst es sich heiß leicht und kalt beträchtlich.

Durch Zerlegung von 2 g Substanz mit verdünnter Salzsäure in mehrere Fraktionen und durch den Vergleich derselben mittels der Verteilungzahl wurde die Einheitlichkeit des Hämoporphyrins bewiesen.

Es ist etwas stärker basisch als Mesoporphyrin, und sein Chlorhydrat ist beträchtlich leichter löslich.

5. Ätioporphyrin $C_{31}H_{36}N_4$.

Das Hämoporphyrin verhält sich beim Erhitzen mit Natronkalk ähnlich dem isomeren Rhodoporphyrin, die Abspaltung von Kohlensäure nimmt aber einen noch weniger glatten Verlauf, so daß viel sauerstoffhaltiges Nebenprodukt auftritt. Es ist vor-

zuziehen, da die Phylline ihr Carboxyl leichter verlieren als die Porphyrine, die Magnesiumverbindung des Hämoporphyrins für die Decarboxylierung anzuwenden.

Das Phyllin des Hämoporphyrins entsteht unmittelbar aus Hämatoporphyrin beim Erhitzen auf 190° in Mengen von 6 g mit Pyridin (160 ccm), methylalkoholischer Kalilauge (90 ccm) und Magnesiumoxyd (2 g) im Autoklaven. In ätherischer Lösung ist es fuchsienrot und fluoresciert stark, durch Säure wird es leicht in Hämoporphyrin mit der Salzsäurezahl $^3/_4$ übergeführt.

Das Kaliumsalz dieses Phyllins erhitzten wir wie Rhodophyllinsalz in kleinen Portionen mit Natronkalk; aus der alkalischen Masse ging Ätiophyllin in Äther, unrein und daher braunrot. Es war wichtig, das Rohprodukt mit Petroläther zu reinigen. Versetzt man die sehr konzentrierte ätherische Lösung mit viel Petroläther, so fallen sofort und noch mehr beim Stehen Flocken von amorphem Nebenprodukt aus. Nach dieser Behandlung ist die Ätiophyllinlösung prächtig violett und fluoresciert schön rot. Das daraus mit Säure und zwar aus petrolätherischer Phyllinlösung schon mit sehr verdünnter Säure gebildete Ätioporphyrin ist über sein Styphnat gereinigt worden; die Ausbeute betrug dann 0,3 g aus 10 g Hämoporphyrin.

Das Ätioporphyrin aus Hämin ist in Alkohol und Äther schwer, in Eisessig leicht löslich mit prächtig blauroter Farbe, während es in Äther bronzerot ist. Die ätherische Lösung gibt an 3prozentige Salzsäure etwa zwei Drittel der Substanz ab, die Verteilungszahl für diese Salzsäure ist 43. Mit Alkali reagiert die Substanz nicht. Beim Erhitzen sintert sie und schmilzt allmählich bei 265°, etwas tiefer als das Präparat aus Phylloporphyrin; der Schmelzpunkt des Styphnates liegt bei 170°. In seinen Merkmalen, wie im Absorptionsspektrum, stimmt das Ätioporphyrin dieser Darstellung mit dem im XXIII. Kapitel beschriebenen genau überein. Dennoch war die Substanz aus Hämoporphyrin wahrscheinlich etwas weniger rein, die Analyse ergab nämlich etwas zu tiefe Werte für Kohlenstoff (79,4—79,6 anstatt 80,1 % C).

In das Ätioporphyrin läßt sich Eisen einführen, wenn man es in Eisessig mit Eisenchlorid und etwas Natriumacetat erwärmt; ohne

den Zusatz von Natriumacetat erfolgt die Substitution nicht. Die Ferriverbindung, braunrot in Ätherlösung, ist zum Unterschied von Ätioporphyrin noch gegen 20prozentige Salzsäure indifferent, stärkere Salzsäure nimmt ohne Abspaltung des Eisens die komplexe Verbindung auf. Mit Alkali reagiert ihre ätherische Lösung sofort, sie wird braun und nimmt intensives gelbes Tingieren an. Dabei erfolgt die Umwandlung des Chlorides in die Base nach der Gleichung:

$$C_{31}H_{34}N_4FeCl + NaOH = C_{31}H_{34}N_4FeOH + NaCl.$$

Dieselbe Reaktion ist mit Mesohäminester und Häminester ausführbar und liefert krystallisierbare Hämatinester.

XXV. Graphische Darstellung der Absorptionsspektra[1]).

Für die Messung der Absorptionsspektren und ihre Darstellung in den Tafeln VI und VII haben wir uns eines von Carl Zeiß in Jena gelieferten Gitterspektroskops nach F. Löwe[2]) mit Wellenlängenschraube bedient, welches ein Gitter von nur geringer Dispersion, nämlich 3610 Linien auf den Zoll, enthält. Wir arbeiteten bei einer Spaltbreite von 0,1 mm mit einer Gasinvertlampe als Lichtquelle.

Zu der zeichnerischen Darstellung sind vier verschiedene Abstufungen verwendet worden: schwarz für —, die schräge Schraffierung für zwei Grade der Absorption, nämlich — — und . . . , die punktierte Schattierung für die Grade . . und . , die gestrichelte Schattierung für die schwächsten Schatten (|).

Die photographischen Aufnahmen (Tafel VIII—XI) haben wir mit einem von Carl Zeiß konstruierten Spektographen mit einem Ives-Gitter von großer Dispersion, nämlich mit 20 000 Strichen pro inch ausgeführt. Die Ausdehnung des Spektrums zwischen den Wellenlängen 400—700 $\mu\mu$ beträgt in dem Apparat mit Objektiven von 21 mm Durchmesser und 420 mm Brennweite auf der Platte 110 mm, die Höhe 10 mm, so daß auf der Platte (9 × 12 cm) acht Spektren untereinander aufgenommen werden können.

Wir haben die wertvollen Erfahrungen benutzt, die E. Rost, F. Franz und R. Heise[3]) hinsichtlich der Photographie des Blut-

[1]) Vgl. Abh. XVII.
[2]) Verhandl. d. Deutsch. Physikal. Ges. X, 671 [1908].
[3]) Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte 32, 223 [1909].

spektrums mitgeteilt haben und uns im Wesentlichen der Versuchsanordnung dieser Autoren bedient. Rost, Franz und Heise erzeugen mit einem Gitter von 15000 Linien ein Spektrum von 46 mm Längenausdehnung; ihre Lichtquelle ist eine Auerlampe.

Statt dieser mußten wir eine Nernstlampe verwenden. Auf einer optischen Bank war dieselbe (Modell für Projektionszwecke, 80HK, 220 Volt, 0,5 Amp.), ferner eine Kondensorlinse (mit ca. 8 cm Brennweite und 6 cm Öffnung) und die Blende mit dem Absorptionstrog verschiebbar befestigt. Das Bild der stabförmigen Lichtquelle wurde bei 11 cm Abstand der Lampe von der Linse und bei einer Entfernung von 15 cm von der Linse zum Spalt scharf auf die Ebene des Spaltes geworfen. Für alle Aufnahmen betrug die Spaltbreite 0,1 mm.

Für die Ortsbestimmung wurde als erstes und letztes Spektrum auf jeder Platte das Funkenspektrum des Heliums aufgenommen. Die auf den Tafeln aufgedruckte Wellenlängenskala mit den Fraunhoferschen Linien und mit vier Heliumlinien haben wir in drei Abschnitten konstruiert, indem wir die Strecken zwischen den Heliumlinien:

667,8—587,6—501,6—447,2

ausgemessen und jede einzeln proportional geteilt haben. Die ganze Skala ist nämlich nicht genau gleichteilig, weil den Wellenlängendifferenzen zwar gleiche Ablenkungswinkel, aber nicht gleiche Abstände in der Plattenebene entsprechen.

Wir haben die Prozeß-Panchromaticplatten von Wratten und Wainwright in Croydon benutzt. Während die im Kaiserlichen Gesundheitsamt photographierten relativ einfachen Spektra der Derivate des Blutfarbstoffs keine Absorption im Rot, sondern nur Bänder beginnend bei $\lambda = 645\,\mu\mu$ aufweisen, handelt es sich bei vielen Chlorophyllderivaten um eine Hauptabsorption im Rot, die bei $\lambda = 690\,\mu\mu$ beginnt. Da hier die Empfindlichkeit der Platten im Rot nicht ausreicht, schlugen wir ein neues Verfahren ein, um die Begrenzung der ersten Bänder herauszubringen.

Wir ließen das ganze Spektrum 50 Sekunden lang auf die Platte einwirken, dann schalteten wir eine 10 mm dicke Schicht einer

0,05 prozentigen wäßrigen Lösung von Croceinscharlach als Rotfilter ein und exponierten weiter. Das Filter absorbiert vollständig bis ungefähr $\lambda = 590\ \mu\mu$. Diese Methode hat sich bewährt, um das Bild in der roten Region zu vervollständigen, wenn auch die Objektivität in der Darstellung dadurch vermindert wird.

Bei den in der XVII. Abhandlung reproduzierten Aufnahmen ist die Nachbelichtung noch nicht mit genügender Anpassung an die variablen Verhältnisse der einzelnen Aufnahmen gehandhabt worden. Bei allen Farbstoffen und bei jeder Schichtdicke wurde damals gleich lang nachexponiert. Die Bänder sind daher namentlich bei den b-Derivaten im Rot bei dünnen Schichten infolge der Überexposition sehr geschwächt auf der Platte, während sie im Spektroskop noch als dunkle Streifen wahrzunehmen sind.

Neuerdings haben wir diesen Fehler vermieden durch kürzere Nachexposition bei den dünnen Schichten, so daß jetzt die spektrographische Darstellung mit dem im Spektroskop beobachteten Bild in allen wesentlichen Punkten übereinstimmt. Der Unterschied in der Intensität der Hauptabsorption im Rot zwischen den entsprechenden Gliedern der a- und der b-Reihe gibt nun annähernd die natürlichen Verhältnisse wieder; b absorbiert im Rot weniger stark als a, im Violett a weniger intensiv als b.

In den angehefteten Tafeln VIII—XI sind unsere neuen spektrographischen Aufnahmen reproduziert worden.

In allen Fällen haben wir Lösungen von 0,043 g Chlorophyll in 1 l Äther oder äquimolekulare Lösungen der Derivate (0,042 g Phäophytin und 0,030 g Chlorin e oder Rhodin g) angewandt und zwar in Schichtdicken von $2^1/_2$, 5, 10, 20 und 40 mm.

Die Exposition ohne Rotfilter dauerte 50 Sekunden; dann wurde bei der $2^1/_2$ mm-Schicht der a-Chlorophyllreihe noch 6 Minuten nachexponiert, bei 5 mm-Schichtdicke noch 7, bei 10 mm 8, bei 20 mm 9 und bei 40 mm noch 10 Minuten. Die Hauptabsorption im Rot der b-Derivate liegt gegenüber a etwas mehr gegen Violett hin, also in einer auf die Platte kräftiger wirkenden Spektralregion; sie fordern daher nur eine kürzere Nachexposition, nämlich die Schicht von $2^1/_2$ mm 3 Minuten, die von 5 mm 4, 10 mm 6, 20 mm 8 und 40 mm 10 Minuten.

Die Spektren der gelben Pigmente wurden in Schichten von 10 mm Dicke mit Lösungen von 0,005 g Substanz in 1 l Alkohol bzw. Schwefelkohlenstoff bei einer Belichtungszeit von 75 Sekunden aufgenommen.

Die Platten haben wir mit Metol-Hydrochinon[1]) bei völliger Dunkelheit in 3 Minuten entwickelt und in saurem Bad fixiert.

Der Vergleich zwischen Photographie und Zeichnung überzeugt uns davon, daß die photographische Aufnahme und Darstellung der Spektra nicht, wie zumeist angenommen wird, eine Methode von größerer Objektivität ist als die Beobachtung mit dem Auge und zeichnerische Wiedergabe der Messungen. Wir stimmen daher nicht ganz überein mit der Ansicht von Rost, Franz und Heise, die als einen unleugbaren Vorteil der Photographie „die völlig objektive Fixierung der Bilder" hervorheben. Der photographischen Methode ist auch viel Subjektivität eigen, die durch die Plattenempfindlichkeit, durch die Belichtung, die Arbeitsweise und die Reproduktion bedingt wird. Wenn unsere Photogramme auch alle beobachteten Absorptionsstreifen nach ihrer Lage richtig wiedergeben, so erhalten die Begrenzungen und Intensitätsverhältnisse doch einen etwas weniger genauen Ausdruck als bei der unmittelbaren Beobachtung mit dem Auge, dessen Empfindlichkeit die der photographischen Platte übertrifft.

[1]) Lösung I: 500 ccm dest. Wasser, 50 g kryst. Na_2SO_3, 5 g Hydrochinon, 1 g Metol; Lösung II: 500 ccm dest. Wasser, 50 g K_2CO_3. Zum Gebrauch: 30 ccm I, 30 ccm II und 60 ccm Wasser; Temperatur 18—20°.

Verzeichnis der abgekürzt zitierten Untersuchungen über Chlorophyll.

Abh. I. Willstätter und Walter Mieg, Über eine Methode der Trennung und Bestimmung von Chlorophyllderivaten. Ann. d. Chem. 350, 1 [1906].

Abh. II. Willstätter, Zur Kenntnis der Zusammensetzung des Chlorophylls. Ann. d. Chem. 350, 48 [1906].

Abh. III. Willstätter und Ferd. Hocheder, Über die Einwirkung von Säuren und Alkalien auf Chlorophyll. Ann. d. Chem. 354, 205 [1907].

Abh. IV. Willstätter und Walter Mieg, Über die gelben Begleiter des Chlorophylls. Ann. d. Chem. 355, 1 [1907].

Abh. V. Willstätter und Adolf Pfannenstiel, Über Rhodophyllin. Ann. d. Chem. 358, 205 [1907].

Abh. VI. Willstätter und Max Benz, Über krystallisiertes Chlorophyll. Ann. d. Chem. 358, 267 [1907].

Abh. VII. Willstätter, Ferd. Hocheder und Ernst Hug, Vergleichende Untersuchung des Chlorophylls verschiedener Pflanzen. Ann. d. Chem. 371, 1 [1909].

Abh. VIII. Willstätter und Hermann Fritzsche, Über den Abbau von Chlorophyll durch Alkalien. Ann. d. Chem. 371, 33 [1909].

Abh. IX. Willstätter und Yasuhiko Asahina, Oxydation der Chlorophyllderivate. Ann. d. Chem. 373, 227 [1910].

Abh. X. Willstätter und Alfred Oppé, Vergleichende Untersuchung des Chlorophylls verschiedener Pflanzen II. Ann. d. Chem. 378, 1 [1910].

Abh. XI. Willstätter und Arthur Stoll, Über Chlorophyllase. Ann. d. Chem. 378, 18 [1910].

Abh. XII. Willstätter, Erwin W. Mayer und Ernst Hüni, Über Phytol I. Ann. d. Chem. 378, 73 [1910].

Abh. XIII. Willstätter und Arthur Stoll, Spaltung und Bildung von Chlorophyll. Ann. d. Chem. 380, 148 [1911].

Abh. XIV. Willstätter und Max Isler, Vergleichende Untersuchung des Chlorophylls verschiedener Pflanzen III. Ann. d. Chem. 380, 154 [1911].

Abh. XV. Willstätter und Ernst Hug, Isolierung des Chlorophylls. Ann. d. Chem. 380, 177 [1911].

Abh. XVI. Willstätter und Max Utzinger, Über die ersten Umwandlungen des Chlorophylls. Ann. d. Chem. 382, 129 [1911].

Abh. XVII. Willstätter, Arthur Stoll und Max Utzinger, Absorptionsspektra der Komponenten und ersten Derivate des Chlorophylls. Ann. d. Chem. 385, 156 [1911].

Abh. XVIII. Willstätter und Yasuhiko Asahina, Über die Reduktion des Chlorophylls I. Ann. d. Chem. 385, 188 [1911].

Abh. XIX. Willstätter und Arthur Stoll, Über die Chlorophyllide. Ann. d. Chem. 387, 317 [1911].

Abh. XX. Willstätter und Max Isler, Über die zwei Komponenten des Chlorophylls. Ann. d. Chem. 390, 269 [1912].

Abh. XXI. Willstätter und Lennart Forsén, Einführung des Magnesiums in die Derivate des Chlorophylls. Ann. d. Chem. 396, 180 [1913].

Abh. XXII. Willstätter, Max Fischer und Lennart Forsén, Über den Abbau der beiden Chlorophyllkomponenten durch Alkalien. Ann. d. Chem., im Druck [1913].

Sachregister.

Abbau des Chlorophylls durch Alkalien 26, 30, 334.
— magnesiumfreier Chlorophyllderivate 353.
— von Chlorophyll, tabellarische Übersicht 32.
— von Hämin 399.
Abgebrühte Blätter 61, 120, 140, 173.
Absolute Chlorophyllbestimmung 80.
Absorptionsspektra
Ätiophyllin und -porphyrin 397.
Chlorin und Rhodin 300.
Chlorophyll a und b 169.
Gelbe Pigmente 245, 250.
Phäophytin a und b 287.
Phylline und Porphyrine 363, 397.
Tafeln I und VI bis XI.
Abspaltung des Eisens aus Hämin 402, 406.
Abtrennung hydrierter Pyrrolbasen 383.
Äthylchlorophyllid, Beschreibung 219.
— Gewinnung 195.
Äthylalkohol, Bestimmung 225.
Ätiophyllin, Beschreibung 395.
— Bildung 392.
— Konstitution 39.
Ätioporphyrin, Beschreibung 396, 412.
— Bildung 394, 411.
— Konstitution 39.
Alkoholyse 13, 173.
— Bestimmung 181.
Allomerisation 29, 147, 314, 319.
Altern der Blätter 179.
Ammonakmethode 363.
Analyse der Chloroplastenfarbstoffe 78.
— hochmolekularer Verbindungen 220.
Apparate:
Autoklaveneinsatz aus Silber 340, 342.
Centrifuge von Leune 400.
Entenkolben 311.
Gitterspektrograph 414.
Gitterspektroskop nach Löwe 414.
Helmkolben 310.
Perkolatoren 66.
Reagensglastropftrichter 49.
Reagierrohr aus Silber 324, 349.
Silberbecher 293, 297, 315.
Silberflasche 315.
Spatel aus Edelmetall 323.
Steinzeugexsikkatoren 258.
Steinzeugnutschen 75.
Syenitwalzenmühle 76.
Taschengitterspektroskop 49.
Trocknungskolben 224.
Vakuumdestillationskolben 310, 311.

Basizität der Chlorophyllderivate 269.
— — Häminderivate 270.
Basizitätsprobe 145, 176, 260.
Bestimmung des Chlorophylls 78.
— von Chlorophyllpräparaten 96.
— von Chlorophyllderivaten 262.
Bildung von Chlorophyll 188.
Blattfarbstoff, Beschreibung in einfachen Versuchen 46.

Blattfarbstoffbestimmung 99.
Blattschnitte 120, 174.
Blattspektrum 60.
Blutcentrifuge 400.
Braunalgenfarbstoff, Bestimmung 117.
Braune Phase 27, 144.
Brennesselmehl, käufliches 57.

Carboxylfreie Stammsubstanzen 391.
Carotin, Beschreibung 242.
— Isolierung 237.
— aus Carotten 240.
— — Corpus luteum 241.
Carotinoide 103, 116, 124, 144, 157.
— Funktion 236.
— Vorkommen 231.
Centrifugieren von Blut 400.
Chlorin e, Beschreibung 297.
— Darstellung 290, 296.
Chlorin f 303.
Chlorin g 305.
Chlorophyll, Abbau 25, 30, 32.
— Beschreibung 143.
— Dritte Komponente 121.
— Eisengehalt 1, 2.
— Funktion 24.
— Gewinnung 126, 132, 135, 138.
— Grignardsche Verbindung 23.
— Kaliumgehalt 3.
— Konstitutionsfragen 25.
— Lecithinhypothese 2, 3.
— Magnesiumgehalt 8.
— Merkmale 17, 143.
— Phosphorgehalt 3.
— Phytolgehalt 11.
— Reinheitsproben 144.
— Spektrum 169.
Chlorophyll aus Braunalgen 117, 141.
— — frischen Blättern 138.
Chlorophyllan 3, 254.
Chlorophyllase 172.
— präparative Verwendung 178, 194.
— Verbreitung 177.
Chlorophyllasearme Pflanzen 178.
Chlorophyllasereiche Pflanzen 177.
Chlorophyllasewirkung 48, 172.
Chlorophyllbestimmung 78.
Chlorophyllgehalt der Blätter 112.
Chlorophyllide, Beschreibung 219, 229.
— Gewinnung 194, 206.
Chlorophyllide, Trennung 210, 216.
Chlorophyllin 313.
Chlorophyllincalcium 318.
Chlorophyllinkalium 319.
Chlorophyllinkalium a 321.
Chlorophyllkomponenten, Beschreibung 166.
— Isolierung 153, 161.
— Spektrum 169.
Chlorophyllpräparate, Bestimmung 96.
Chloroplasten 58, 175.
Chlorophyllsynthese 188, 325.
Chromatographische Adsorptionsanalyse 16, 156, 234.
Chrysophyll 232.
Cyanophyllin, Beschreibung 354.
— Bildung 327.
— Gewinnung 348.
Cyanoporphyrin 359.

Dichromatinsäure 4.
Dihydrophytol 312.
Doppelextrakte 65.
Dynamik der Enzymwirkung 183.

Einführung von Magnesium 11, 323.
Enteisenung 402, 406.
Entmischung nach Stokes und Kraus 129, 147, 154, 210.
Enzyme 99, 141, 172.
Enzymmenge 179.
Enzymwirkung, Dynamik 183.
Erythrophyll 232.
Erythrophyllin, Beschreibung 356.
— Gewinnung 348.
Erythroporphyrin 352, 359.
Esterase 172.
Etiolin 232.
Extraktionskoeffizient 259.
Extraktionsmethoden 58, 64, 99.
— neue 70, 74.
Extraktion frischer Blätter 76, 99, 138.

Fällungskoeffizient 256.
Fehlerquellen bei der Komponentenbestimmung 87.
Fichtenspahnreaktion 379.
Flaschenextrakte 65.
Fraktionierung der Spaltungsprodukte 102, 145, 264, 293.
— mit Salzsäure 262.

Fraktionierte Salzbildung mit Pikrinsäure 377, 382.
Freie Chlorophyllide 206, 229.
Freie Phaeophorbide 285.
Frische Blätter, Verarbeitung 76, 99, 138.
Fukoxanthin, Beschreibung 236, 247.
— Bestimmung 123.
— Geschichte 117.
— Isolierung 247.

Galeopsis tetrahit 177.
Gelbe Pigmente 103, 123.
— — Prüfung auf 144, 260.
— — Trennung 103, 237.
Gelbe Phase 168, 283.
Geschichte der Chlorophyllforschung 1, 153, 252.
Geschwindigkeit der Chlorophyllasereaktion 183.
Glaukophyllin, Beschreibung 354.
— Gewinnung 345.
— Umkrystallisation 347.
Glaukoporphyrin 358.
Graphische Darstellung der Spektra 414.
Grignardsche Lösungen, Einwirkung auf Chlorophyllderivate 328, 331.

Hämatinsäure 370.
Hämatoporphyrin 402, 406.
— Molekulargewicht 44.
Hämatoporphyrindimethylätherdimethylester 404.
Hämidoporphyrin 270.
Hämin, Formel 35.
— Gewinnung 399.
— Konstitution 42.
Häminoporphyrin 270.
Hämoporphyrin 34, 43, 408, 410.
— Konstitution 43.
Hämopyrrole 376.
Hämopyrrol a und e 381.
— Beschreibung 389.
— Fraktionierung 386.
Heiße Verseifung 29, 296, 314.
Heracleum 177.
Hochmolekulare Verbindungen, Analyse 221.
Hydrolyse des Chlorophylls 173.
— — — Bestimmung 179.

Jodalphyle, Bestimmung 226.
Jodsilberzahl 182.

Isochlorophyllin 313, 315.
— a 315.
Isohämopyrrol 381.
— Beschreibung 390.
— Isolierung 385.

Kalte Verseifung 28, 317.
Kolloidale Chlorophyllösung 60, 167.
— — Spektrum 171.
Komplexe Bindung des Magnesiums 9, 24.
Komplexe Kaliumverbindungen 301.
Komponentenbestimmung, Fehlerquellen 87.
Komponentenverhältnis 84, 109.
Komponenten von Chlorophyll 15, 121, 153, 166.
Konstitutionsfragen 25.
Kraussche Entmischung 147, 154, 210.
Kryptopyrrol 381.
Krystallisiertes Chlorophyll, Beschreibung 219.
— — Gewinnung 195.
— — nach Borodin 6, 176.
Kupferchlorophyllverbindungen 323.

Lactamtheorie der braunen Phase 27, 335.
Lactamtheorie des Hämins 40.
Lagern der Blätter im Eisschrank 62.
Lipochrome des Tierreichs 235.
Lutein 242, 247.
Lycopin 241, 246.

Magnesiat 325.
Magnesiumgehalt des Chlorophylls 143.
— — — Prüfung auf 145.
Magnesiumkomplexbildung 9, 11, 323.
Merkmale des Chlorophylls 17, 49, 143.
Mesohämatin 409.
Mesohämin 408.
Mesoporphyrin 43, 408.
Methanolyse 173.
Methyläthylmaleinimid 35, 370.
Methylchlorophyllid, Gewinnung 201, 203.
— Hydrolyse 209.

Methylchlorophyllid, Trennung 211.
— a, Beschreibung 227.
— b, Beschreibung 228.
Methylakohol, Bestimmung 225.
Methylphäophorbid a 284.
— b 285.
Methylphäophorbide, Trennung 278.
Mikroskopische Blattschnitte 120, 174.
Molekulargewichtsbestimmungen 44, 169, 233.

Normale Spaltungsprodukte 143, 265.
Nutschenverfahren 68, 74.

Oxydation der Chlorophyllderivate 369.
— von Phylloporphyrin 371.
— — Hämin 374.
Oxyhämoglobinlösung 401.

Perkolate 66.
Pentabromid des Hämatoporphyrins 404.
Pflanzenarten 57, 152.
Pflanzenmaterial 53.
Phäophorbid a, Beschreibung 285.
— b, Beschreibung 286.
Phäophorbide, Bildung 281.
— Trennung 281.
Phäophyceenfarbstoffe, Bestimmung 117.
— Darstellung 141.
Phäophytin 251.
— Beschreibung 259.
— Definition 251.
— Gewinnung 254.
— Trennung 274.
— a 283.
— b 284.
Phase, braune 27, 144.
— gelbe 168.
— rote 168.
Phasenprobe 144, 212, 260.
Phasenspektrum 168.
Phasentheorie 27.
Phylline, Tabellen 337, 338, 362.
Phyllophyllin, Beschreibung 357.
— Bezeichnung 334.
— Gewinnung 342.
— aus Phäophytin 344.
Phyllophyllincäsium 357.
Phyllophyllincalcium 358.
Phyllophyllinmethylester 330.
Phylloporphyrin, Beschreibung 360.
— Geschichte, 4, 336.
— Gewinnung 351.
Phyllopyrrol 378.
— Beschreibung 389.
— Isolierung 387.
— Synthese 382.
Phytansäure 312.
Phytochlorin a bis d 262.
— e, Beschreibung 297.
— e, Bildung aus Chlorophylliden 296.
— e, Darstellung 290.
— f 303.
— g 305.
Phytorhodin a bis f 262.
— g, Beschreibung 299.
— g, Bildung aus Chlorophylliden 296.
— g, Darstellung 290.
— i und k 306.
Phytol, Beschreibung 311.
— Bestimmung 309.
— Gewinnung 291, 308.
— Konstitution 11.
— Vorkommen 151.
Phytolgehalt des Chlorophylls 12, 143, 151.
— — — Prüfung auf 145.
Phytolzahl 151, 181, 309.
Phytylphäophorbid a 283.
— b 284.
Porphyrine, Tabellen 335, 362.
Pyrrole aus Chlorophyll 389.
Pyrrolhomologe 377.
Pyrrophyllin, Beschreibung 356.
— Gewinnung 340.
— Umkrystallisation 342.
Pyrrophyllincalcium 357.
Pyrroporphyrin, Beschreibung 360.
— Gewinnung 352.

Reduktion der b-Komponente 331.
— — Chlorophyllderivate 376.
Reinchlorophyll, Gewinnung 132, 138.
Reinheitsgrad der Chlorophyllpräparate 82, 96.
— — Chlorophyllösungen 64, 83.
Relative Chlorophyllbestimmung 79.

Rhodin g, Beschreibung 299.
— g, Darstellung 290, 296.
— i und k 306.
Rhodophyllin 355.
— Gewinnung 347.
Rhodophyllinkalium 355.
Rhodoporphyrin 351, 359.
Rohchlorophyll 135.
— aus Braunalgen 141.
Rote Phase 168, 284.
Rubiphyllin, Beschreibung 356.
— Gewinnung 350.
Rubiporphyrin 360.

Salzsäurezahl 14, 268.
Säurespaltung, ältere Methoden 252.
Spaltungsprobe 145, 260.
Spektrophotogramme, Tafel VIII bis XI.
Stammsubstanzen, carboxylfreie 391, 411.
Styphnate 390, 397, 412.
Synthese, partielle, von Chlorophyll 188, 323.

Trennung der Chlorophyllkomponenten 15, 101, 153, 161.
— — gelben Pigmente 103.
— — von Chlorophyllderivaten 14, 262.
Trockengehalt 108.
Trockengewicht der Blätter 54.
Trocknung der Blätter 54.
Trocknung im Hochvakuum 221.

Umesterung von Chlorophyll 13, 173.
— — Phäophytin 279.
Umlactamisieren 27. 335.
Umscheiden 90, 261.
Umwandlungszahl 182.

Verarbeitung frischer Blätter 55, 75.
Verbreitung der Chlorophyllase 177.
Vergleichende Untersuchung des Chlorophylls verschiedener Pflanzen 149.
Vergleichslösungen 97, 104.
Verhalten des Chlorophylls gegen Lösungsmittel 147.
Verhältnis a : b 84, 109.
— Carotin: Xanthophyll 109.
— Grün : Gelb 109.
Verschiedenheit der Chlorophylle 6, 150.
Verseifung von Chlorophyll 296, 314.
— — Phäophytin 290.
Verteilungszahl 271.
Vorbehandlung frischer Blätter 56, 62, 203.
Vorextraktion 59, 128.

Wasserhaltige Lösungsmittel 63, 70, 74.
Wasserzusatz bei der Enzymwirkung 185.

Xanthophyll α, α', α'', β 234.
— Beschreibung 243.
— Isolierung 237.

Zeichnerische Darstellung der Spektren, Tafeln VI und VII, 414.
Zinkchlorophyllverbindungen 323.
Zinkgehalt der Gläser 324.
Zustand des Chlorophylls in den Blättern 58, 60.

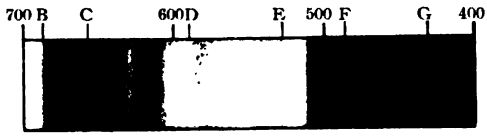


Fig. 1. Spektrum des Blattfarbstoffes in Aceton.

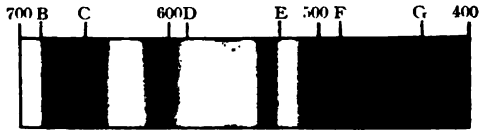


Fig. 2. Spektrum des angesäuerten Extraktes.

Chlorophyll a

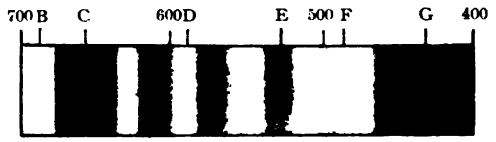
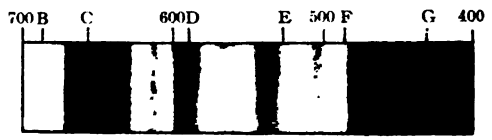


Fig. 3. Spektrum der beiden Chlorophyllkomponenten.

Chlorophyll b



Carotin

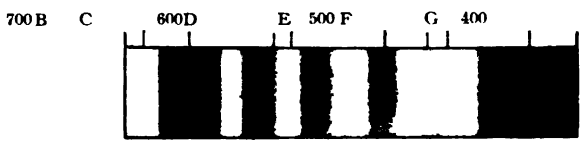
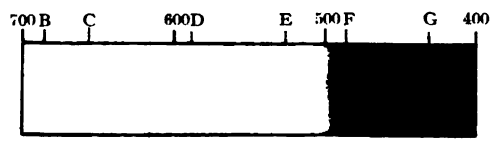


Fig. 4. Spektrum der gelben Pigmente.

Xanthophyll



Verlag von Julius Springer in Berlin.

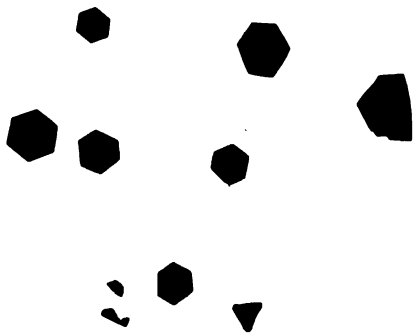


Fig. 1. Krystallisiertes Chlorophyll (Äthylchlorophyllid).

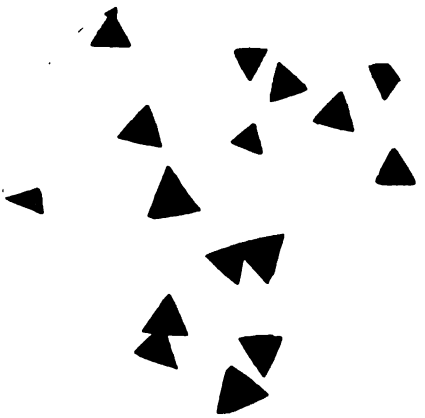


Fig. 2. Äthylchlorophyllid aus Methylal.

Fig. 3. Methylchlorophyllid a.

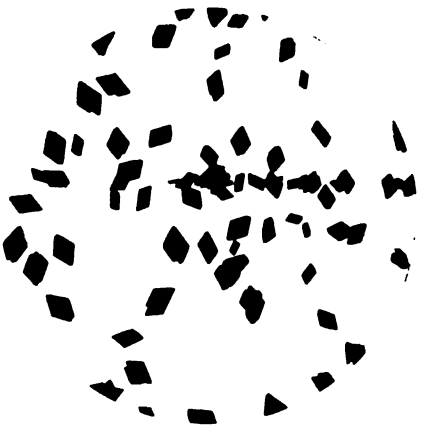


Fig. 4. Methylchlorophyllid b.

Verlag von Julius Springer in Berlin.

Fig. 1. Carotin aus Schwefelkohlenstoff-Alkohol.

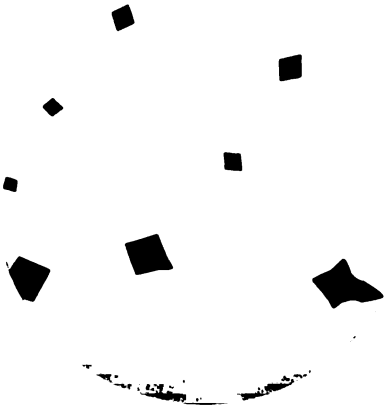


Fig. 2. Carotin aus Petroläther.

Fig. 3. Xanthophyll aus Äthylalkohol.

Fig. 4. Xanthophyll aus Methylalkohol.

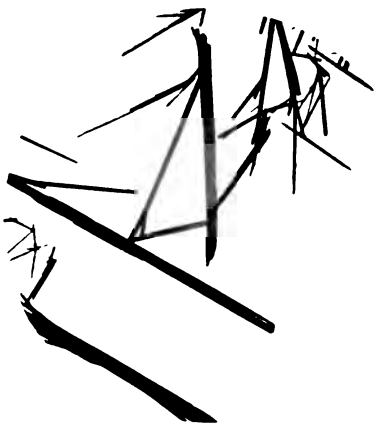


Fig. 5. Fucoxanthin aus Methylalkohol.

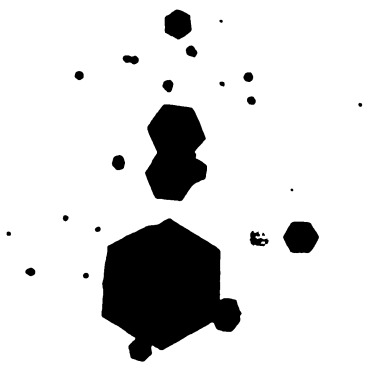


Fig. 6. Fucoxanthin aus verd. Alkohol.

Verlag von Julius Springer in Berlin.

Fig. 1. Methylphäophorbid a.

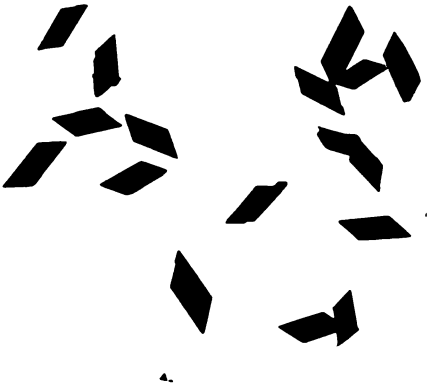


Fig. 2. Methylphäophorbid b.

Fig. 3. Phytochlorin e.

Fig. 4. Phytorhodin g.

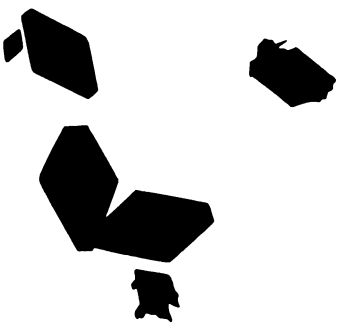


Fig. 5. Phytochlorin f.

Verlag von Julius Springer in Berlin.

Fig. 1. Glaukophyllin.

Fig. 2. Rhodophyllin.

Fig. 3. Pyrrophyllin.

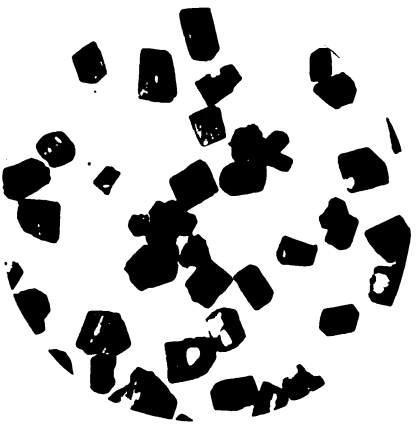
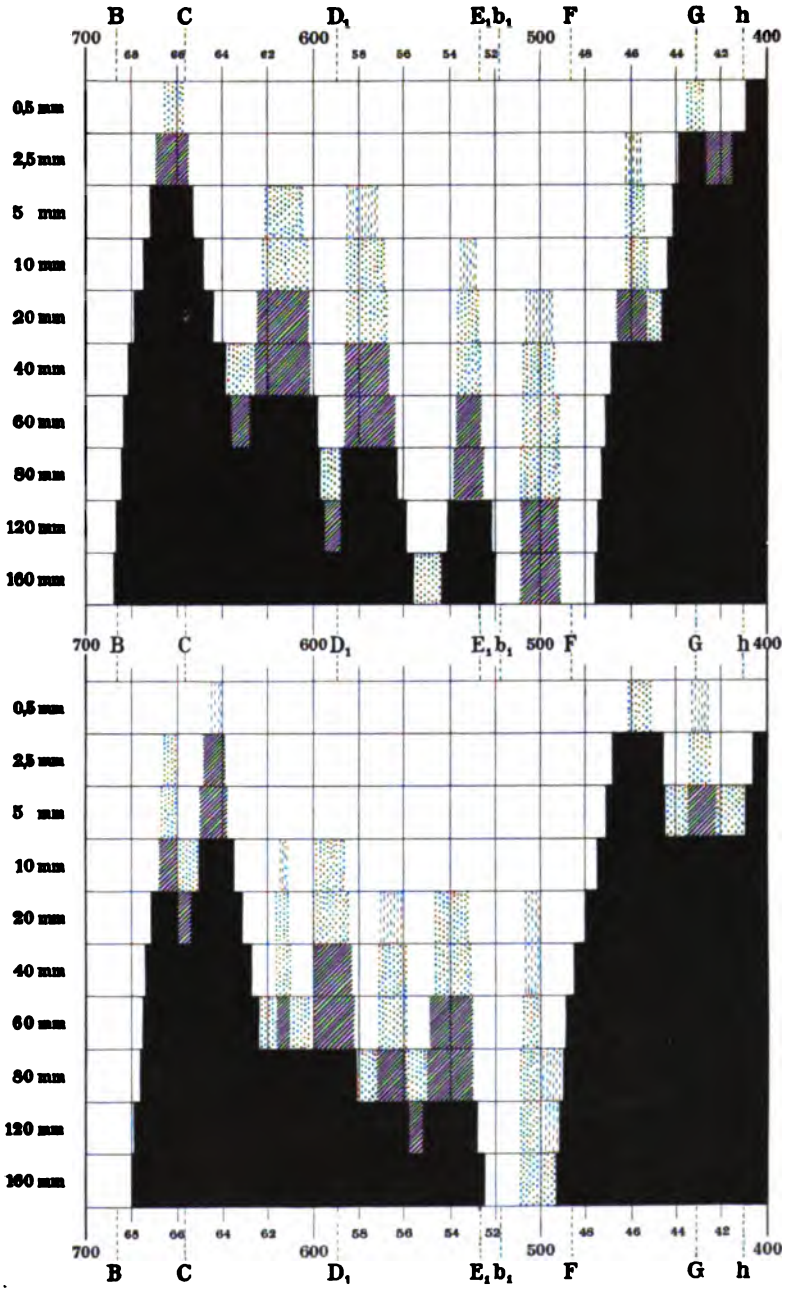


Fig. 4. Phyllophyllincäsium.

Fig. 5. Pyrroporphyrin.

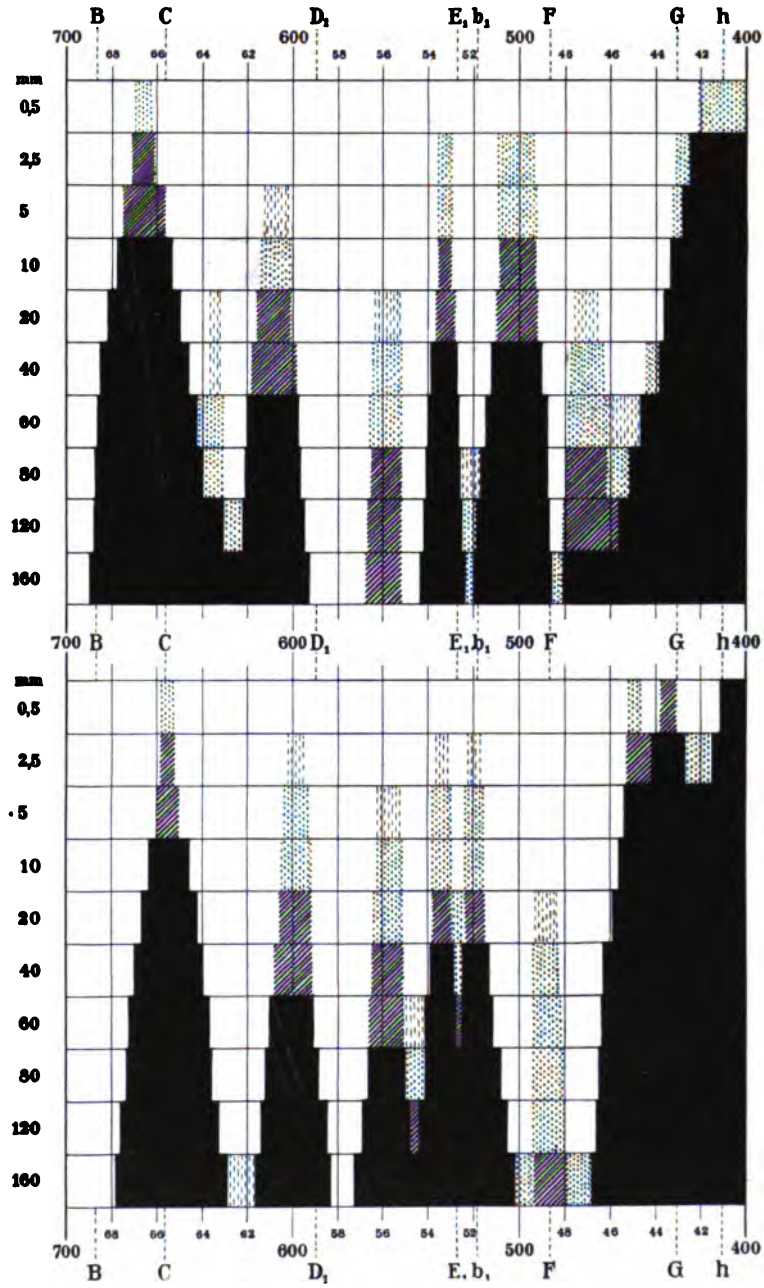
Fig. 6. Phylloporphyrin.

Verlag von Julius Springer in Berlin.



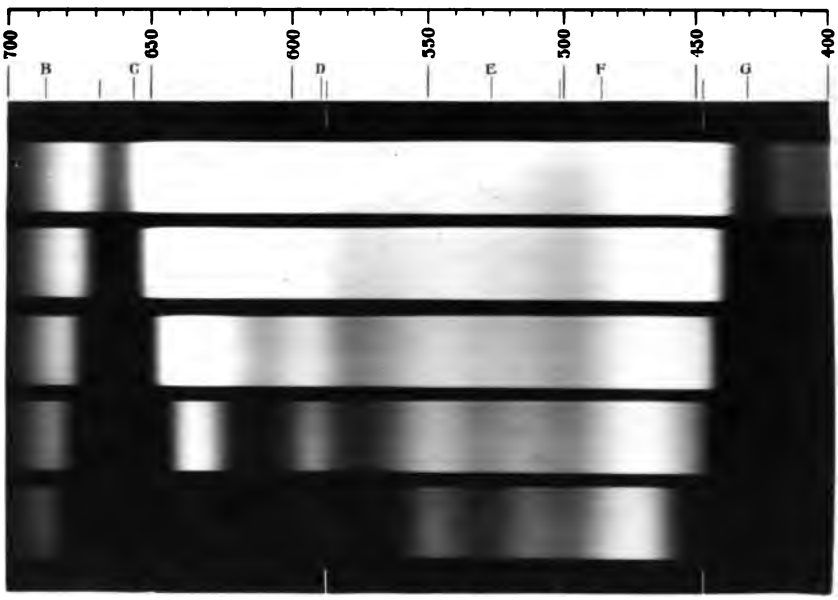
Die Methylchlorophyllide: a (oben) und b (unten).

Verlag von Julius Springer in Berlin.

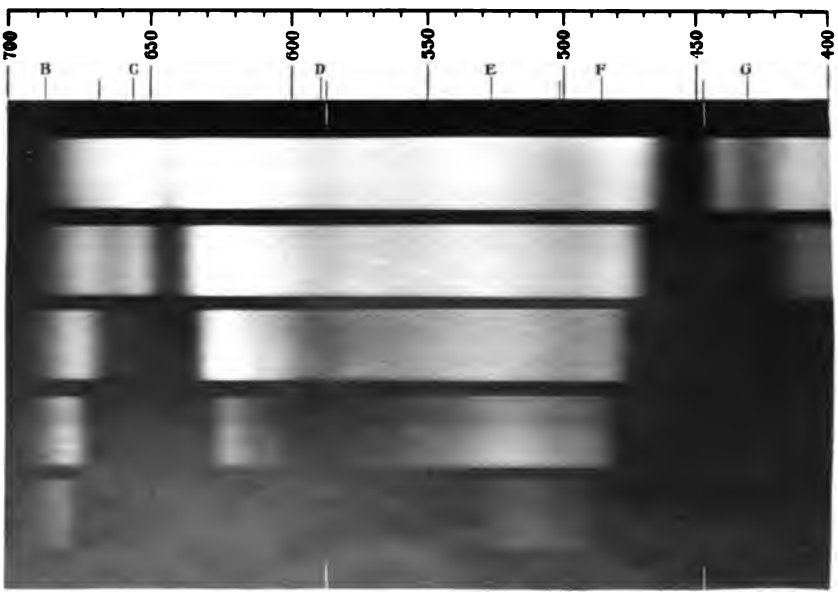


Die Methylphäophorbide: a (oben) und b (unten).

Verlag von Julius Springer in Berlin.

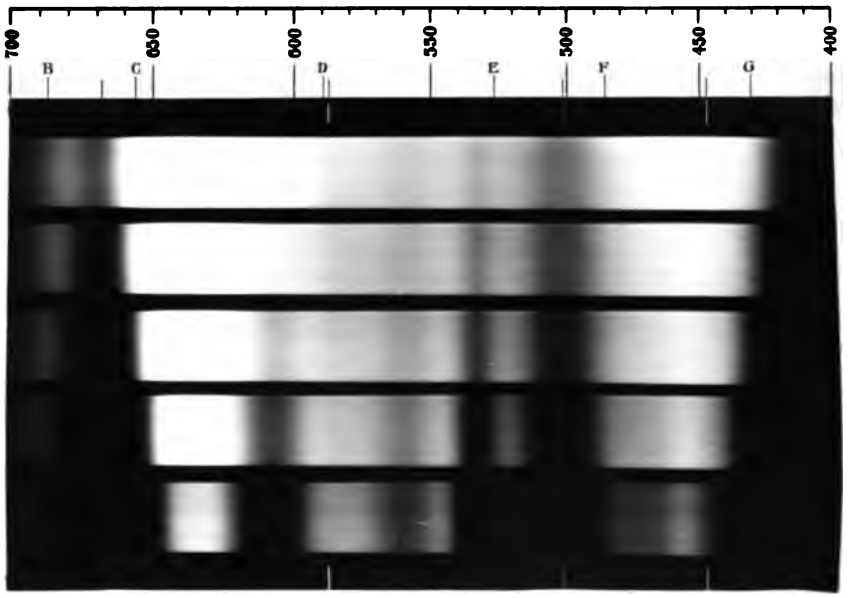


Chlorophyll a

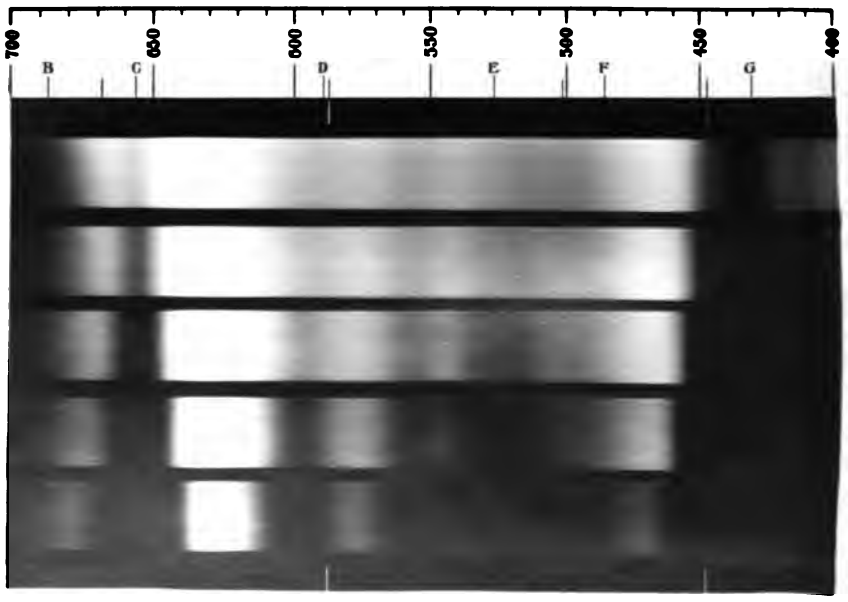


Chlorophyll b

Verlag von Julius Springer in Berlin.

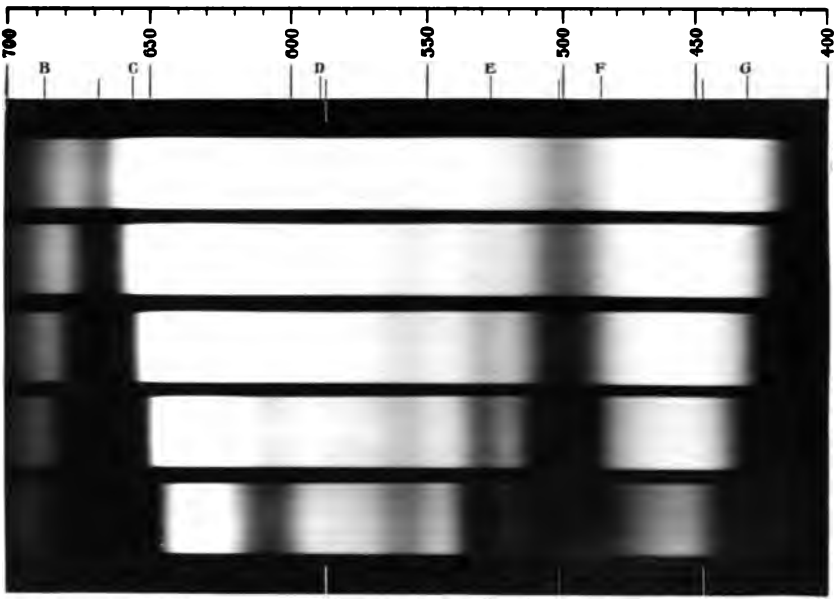


Phaeophytin a

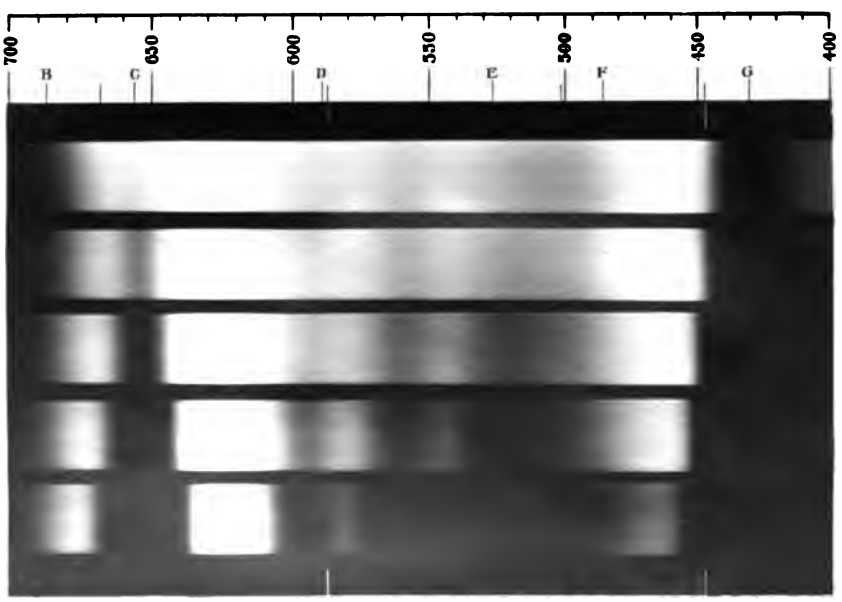


Phaeophytin b

Verlag von Julius Springer in Berlin.

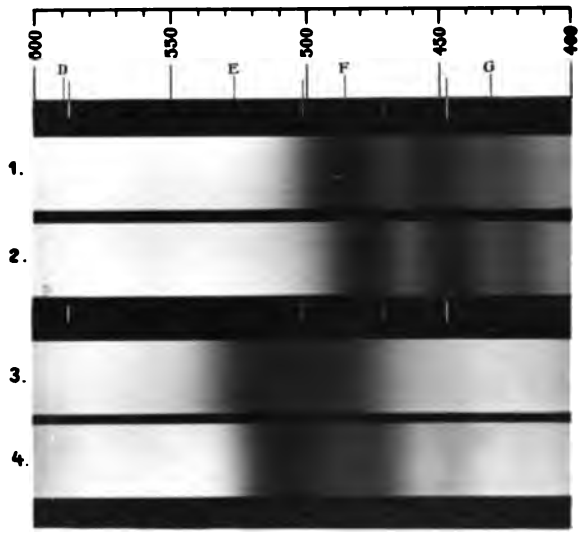


Phytochlorin e



Phytorhodin g

Verlag von Julius Springer in Berlin.



1. Carotin in Alkohol.
2. Xanthophyll in Alkohol.
3. Carotin in Schwefelkohlenstoff.
4. Xanthophyll in Schwefelkohlenstoff.

Verlag von Julius Springer in Berlin.